

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 986 149**

51 Int. Cl.:

A61K 31/202 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 15/02 (2006.01)

A61K 35/60 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.10.2019 PCT/US2019/054234**

87 Fecha y número de publicación internacional: **16.04.2020 WO20076578**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.10.2019 E 19791396 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024 EP 3863622**

54 Título: **Tratamiento de trastornos vulvovaginales**

30 Prioridad:

09.10.2018 US 201862743237 P
22.10.2018 US 201862748875 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.11.2024

73 Titular/es:

UNIVERSITY OF ROCHESTER (100.0%)
265 Crittenden Boulevard, Box URV
Rochester, NY 14642, US

72 Inventor/es:

FOSTER, DAVID;
FALSETTA WOOD, MEGAN, L. y
PHIPPS, RICHARD, P.

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

ES 2 986 149 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de trastornos vulvovaginales

5 Referencia cruzada a solicitud relacionada

Esta solicitud reivindica prioridad a la solicitud provisional de Estados Unidos No. 62/743,237 presentada el 9 de octubre de 2018 y a la solicitud provisional de Estados Unidos No. 62/748,875 presentada el 22 de octubre de 2018.

10 Intereses del gobierno

Esta invención se realizó con el apoyo gubernamental bajo HD069313 otorgado por National Institutes of Health. El gobierno tiene ciertos derechos en la invención.

15 Campo de la invención

La presente invención se refiere al tratamiento de trastornos vulvovaginales tal como irritación y/o inflamación del tracto reproductor femenino como se define en las reivindicaciones.

20 Antecedentes de la invención

Los trastornos vulvovaginales se refieren a una gama de enfermedades y condiciones que afectan la vulva y vagina. Algunos de los trastornos vulvovaginales incluyen irritación, tal como dolor y prurito, del tracto reproductor femenino. Este dolor o prurito es un problema clínico significativo para el cual existen pocas terapias efectivas. Por ejemplo, la vulvodinia provocada localizada (LPV), que se caracteriza por dolor agudo y duradero en respuesta al toque ligero del vestíbulo vulvar (área que rodea inmediatamente la abertura vaginal), afecta hasta a 1 de cada 3 mujeres durante su vida y provoca angustia psicológica significativa y disfunción sexual (Harlow, BL; Kunitz, CG; Nguyen, RH; Rydell, SA; Turner, RM; MacLehose, RF. Am J Obstet Gynecol 2014, vol. 210, pp. 40 e1-8). Por lo tanto, la LPV es un problema de salud significativo de las mujeres. El dolor vestibular se asocia con una reducción significativa en la calidad de vida. Aunque las mujeres afectadas por LPV experimentan dolor profundo, no muestran signos evidentes de enfermedad tal como lesiones o infecciones (Sadownik, LA. Int J Womens Health 2014, vol. 6, pp. 437-49). Los orígenes de la enfermedad se conocen pobremente, con pocos modelos disponibles para la prueba preclínica de posibles nuevas terapias (Falsetta, M.L., et al. Journal of Lower Genital Tract Disease 2017, vol. 21, no. 4, supplement 1). Todas las terapias actualmente disponibles solo gestionan el dolor y angustia psicológica, pero no se dirigen a las causas biológicas subyacentes de la enfermedad. Existe la necesidad de tratamiento de la irritación del tracto reproductivo, como dolor y prurito.

40 Sumario de la invención

La invención proporciona un mediador pro-resolutivo para usarse en un método para reducir o prevenir la irritación del tracto genital inferior en un sujeto mujer, el método que comprende administrar una cantidad efectiva del mediador pro-resolutivo de manera tópica a un sitio de tratamiento del tracto genital inferior del sujeto, donde la irritación se asocia con una condición inflamatoria del tracto genital seleccionada del grupo que consiste en vulvodinia provocada localizada (LPV), liquen plano, liquen escleroso, vaginitis inflamatoria descamativa, vulvovaginitis atrófica asociada con cáncer de mama y prurito crónico, y donde el mediador pro-resolutivo se selecciona del grupo que consiste en resolvína D2, resolvína D3, resolvína D4, resolvína D5, resolvína E1, maresina-1, epi-maresina-1, lipoxina A4, protectina D1, protectina DX y DHA; o (2) una mezcla que comprende DHA, 14-HDHA, 17-HDHA y 18-HEPE.

50 En particular, el mediador pro-resolutivo proporciona un medio para reducir, prevenir o tratar la irritación del tracto genital inferior (tal como dolor o prurito) en un sujeto. Una cantidad efectiva del mediador pro-resolutivo se administra de manera tópica a un sitio de tratamiento del tracto genital inferior del sujeto.

55 En una realización, la condición inflamatoria del tracto genital es LPV. El sitio de tratamiento puede comprender el vestíbulo vulvar, vulva externa, vestíbulo o vagina.

60 El mediador pro-resolutivo se puede administrar a 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg en el sitio de tratamiento. El mediador pro-resolutivo se puede administrar una vez a la semana, 2-3 veces a la semana, una vez al día, dos veces al día o tres veces al día. En ciertos ejemplos, el sujeto puede ya tener una enfermedad o condición (tal como vulvovaginitis atrófica asociada con cáncer de mama u otras mencionadas en la presente) y el mediador pro-resolutivo se puede administrar antes de que el sujeto se exponga a una estimulación secundaria que provoca irritación (por ejemplo, relaciones sexuales y uso de tampones).

65 El mediador pro-resolutivo puede comprender además administrar un segundo agente terapéutico (por ejemplo, un segundo mediador pro-resolutivo, un agente antimicrobiano o un agente antiviral) al sujeto.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción más adelante. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción y a partir de las reivindicaciones.

5

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es un diagrama que muestra los sitios de dolor intenso en el vestíbulo de pacientes con LPV en proximidad cercana a sitios no dolorosos de la vulva externa y sitios de biopsia relacionados.

10

La figura 2 es un esquema de la biosíntesis de SPM. Los mediadores lipídicos pro-resolutivos especializados (SPM) se derivan de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de las familias omega-3 y omega-6. Los PUFA y otros precursores de SPM, tal como DHA y EPA (en la familia omega-3), pasan a formar SPM, tal como maresinas, protectinas y resolvinas.

15

Las figuras 3A y 3B son un conjunto de diagramas que muestran procedimientos para (A) investigar la capacidad de reducir la producción de mediadores proinflamatorios y pro-dolor de células humanas primarias en un modelo de LPV *in vitro* y (B) evaluar la eficacia de SPM para aliviar el dolor usando un modelo de ratón preclínico de LPV.

20

Las figuras 4A, 4B y 4C son un conjunto de diagramas que muestran que la producción de mediadores inflamatorios está elevada en células vestibulares de pacientes con LPV en comparación con células vulvares o sujetos de control. Panel A: IL-6 liberada en respuesta a dosis decrecientes de *C. albicans* vivo. * $p < 0,05$ vehículo versus dosis de *C. albicans* (solo para células vestibulares), ** $p < 0,05$ células vestibulares versus vulvares para una dosis particular. ANOVA, $n = 4$. Las células vestibulares muestran una fuerte respuesta, en tanto que las células vulvares no muestran respuesta significativa a una dosis hasta 1000 veces mayor.³ Panel B: Los fibroblastos cultivados se estimularon con vehículo o zymosan (100 $\mu\text{g/ml}$) durante 24 horas, entonces se analizaron los medios para prostaglandina E_2 (PGE_2). Zymosan indujo un incremento significativo en PGE_2 sobre el tratamiento con vehículo correspondiente. Los fibroblastos vestibulares de pacientes con LPV produjeron más PGE_2 en comparación con los fibroblastos vestibulares de los sujetos de control. Media \pm SEM. ANOVA * $p < 0,05$. Panel C: Diagrama de dispersión de la producción de PGE_2 de fibroblastos graficada contra la transformación logarítmica del umbral de dolor mucocutáneo, realizada antes del muestreo de tejido, de sitios anatómicos idénticos. La línea central (rojo sólido) representa valores ajustados de regresión lineal delimitados por intervalos de confianza de 95 % (línea de puntos azul). $t = 2,58$, $p = 0,04$.

25

30

35

Las figuras 5A, 5B, 5C y 5D son un conjunto de diagramas que muestran que la producción de PGE_2 e IL-6 se reduce por los SPM. Los fibroblastos vestibulares o vulvares de paciente se pretrataron durante 10 horas con lipoxina A_4 (LxA_4), resolvina D_2 (RvD_2), (7R)-maresina 1 o epi(7S)-maresina 1 a una concentración de 5 nM, entonces se activaron con IL-1 β (panel A; 10 $\mu\text{g/ml}$) o bradiquinina (panel B; 100 nM) durante 48 horas. Los medios de cultivo se recolectaron y analizaron para contenido de PGE_2 (Panel A) o IL-6 (Panel B). Los fibroblastos de paciente también se activaron primero con IL-1 β durante 30 min, entonces se trataron con (7R)-maresina 1 o LxA_4 5 nM durante 18 horas, seguido por una dosis de refuerzo durante 6 h. Los medios de cultivo se recolectaron y analizaron para contenido de PGE_2 (Panel C) o IL-6 (Panel D). Media \pm SEM de $n = 3$, ANOVA * $p < 0,05$ versus solo activación (sin SPM). Estos resultados fueron consistentes para varias cepas adicionales de pacientes con LPV.

40

45

La figura 6 es un diagrama que muestra que los SPM inhiben la producción de PGE_2 a partir de tejido vulvar de ratón. Se recolectó tejido vulvar de ratón (biopsias por punción de 4 mm) y se biseó y entonces se trató previamente en medio de cultivo con maresina 1 o RvD_2 a las concentraciones indicadas durante 18 horas, seguido de una estimulación adicional de 18 horas con IL-1 β (10 $\mu\text{g/ml}$). El medio de cultivo se recolectó y analizó para contenido de PGE_2 . Media \pm SEM; $n = 3$ replicadas de cultivos. ANOVA * $p < 0,05$ versus vehículo.

50

Las figuras 7A, 7B y 7C son un conjunto de fotografías y diagramas que muestran pruebas de dolor para modelo de vulvodinia de ratón *in vivo*. Panel A: Después de la inyección de zymosan, la inflamación y enrojecimiento llegan a ser evidentes. La flecha indica el sitio de inyección. Panel B: Imagen que muestra cómo se usa un cabello electrónico de von Frey (Mousemet) para aplicar fuerza a la vulva de ratón. Panel C: Esquema de modelo de ratón *in vivo* para establecer y entonces resolver alodinia vulvar.

55

La figura 8 es un diagrama que muestra un perfil de dolor representativo para un ratón C57BL/6. Esta serie de diagramas de caja muestra la mediana de los valores de umbral para un ratón representativo durante las fases de inducción, persistencia y tratamiento. Las medidas recolectadas cada semana se distribuyeron estrechamente, y los umbrales se redujeron $>33\%$ y se mantuvieron hasta el tratamiento con maresina 1, cuando los valores regresaron a la línea de base.

60

La figura 9 es un diagrama que muestra que PGE_2 en el lavado vaginal se asocia con un umbral de dolor. Después de la inducción de alodinia durante hasta 6 semanas (indicado por un umbral de dolor reducido, línea roja), se aplicó maresina 1 a vulvas de ratón C57BL/6 para reducir el dolor e incrementar el umbral de dolor. El contenido

65

de PGE₂ en las muestras de lavado vaginal (línea azul) incrementa rápidamente durante la fase de inducción, que indica que la inflamación asociada al dolor disminuye con el tratamiento. SEM mostrado, n = 8.

5 La figura 10 es un diagrama que muestra que los SPM se producen por fibroblastos vulvares. Los fibroblastos se cultivaron durante 48 h con IL-1 β (10 pg/ml), entonces se recolectaron los medios de cultivo y se congelaron inmediatamente en hielo seco bajo gas argón para análisis lipídómico dirigido. Los SPM predominantes detectados se derivaron de DHA.

10 La figura 11 es un diagrama que muestra que la suplementación con DHA también reduce la producción de mediadores proinflamatorios, probablemente debido a la producción de SPM. Los fibroblastos vestibulares o vulvares se pretrataron con DHA (200 nM) durante 72 h, entonces se activaron con IL-1 β (10 pg/ml) durante 72 h. Los medios de cultivo se recolectaron y analizaron para contenido de PGE₂. Media +/-SEM de n = 3 replicadas de muestras de tratamiento. ANOVA *p < 0,05 versus tratamiento con vehículo correspondiente.

15 Las figuras 12A, 12B y 12C son un conjunto de fotografías que muestran que la valoración manual de von Frey del umbral de dolor denota una mejora en el umbral con tratamiento. Los umbrales disminuidos en los ratones tratados con zymosan después de 4 semanas de inyección refleja dolor/sensibilidad incrementada, media +/- SEM, n = 8 solución salina, n = 12 zymosan, ANOVA *p < 0,05 (Panel A). El tratamiento terapéutico después de la fase de inducción incrementó los umbrales de dolor. Media +/- SEM, n=7, p > 0,05 (Panel B). El líquido de lavado vulvovaginal se analizó para contenido de PGE₂ (Panel C). Los ratones que reciben zymosan tuvieron PGE₂ elevada en su líquido de lavado versus ratones que reciben inyección de solución salina. Además, los ratones tratados con alodinia tuvieron PGE₂ reducida. Media +/- SEM, n = 7, ANOVA *p < 0,05.

25 La figura 13 es un diagrama que muestra que los ratones se recuperan con el paso del tiempo con el tratamiento de DHA. Se consideró que los ratones se habían recuperado si mostraban al menos una mejora de 70 % en su umbral de dolor durante dos semanas consecutivas. En el eje x, la semana denota la primera semana en un período de dos semanas durante el cual los ratones mostraron mejora de 70%. Los ratones comenzaron a recuperarse tan pronto como en la semana 1 en el grupo de DHA. Para la semana 3, la mayoría de los ratones se habían recuperado en los grupos de DHA y placebo, en tanto que ningún ratón se había recuperado en el grupo tratado con simulación.

35 La figura 14 es un diagrama que muestra el por ciento de mejora durante las primeras tres semanas de tratamiento con DHA. El por ciento de mejora en el umbral de dolor (sobre el umbral de dolor pre-tratamiento más bajo) fue mayor en el grupo de DHA durante las primeras dos semanas. Para la semana 3, el por ciento de mejora fue similar entre los grupos de DHA y placebo, pero mayor que el grupo de simulación. Media +/- SEM.

40 La figura 15 es un diagrama que muestra los niveles de PGE₂ en lavados vulvovaginales. Los niveles de PGE₂ incrementaron con la inyección de zymosan y disminuyeron con el tratamiento. Durante las primeras tres semanas de tratamiento, los niveles disminuyeron y se mantuvieron bajos en los grupos de DHA y placebo.

45 La figura 16 es un diagrama que muestra que los ratones se recuperan con el paso del tiempo con el tratamiento. Se consideró que los ratones se habían recuperado una vez que alcanzaron umbrales que fueron 66 % (+/- 0,5 g de fuerza) de su umbral de línea de base (antes de la inducción de dolor) durante dos semanas consecutivas. En el eje x, la semana denota la semana de tratamiento; después de la semana 2, se consideró que los ratones se habían recuperado si los umbrales de semana 1 y 2 cumplían con criterios de 66 %. El porcentaje de ratones que se recuperan se lista por arriba de los puntos de datos. Los ratones comenzaron a recuperarse tan pronto como en la semana 2 en el grupo de LIPINOVA alto y bajo. Para la semana 4, 8 (67 %) ratones en el grupo de LIPINOVA alto se habían recuperado, en tanto que 2 se habían recuperado en el grupo de dosis baja. Los únicos otros ratones que se recuperaron incluyeron 1 ratón en el grupo de placebo. Estos datos muestran que la dosis alta de LIPINOVA es más efectiva para provocar la recuperación.

55 Las figuras 17A y 17B son diagramas que muestran el por ciento de mejora durante cuatro semanas de tratamiento. A) Los datos se grafican como el por ciento de umbral medio para cada grupo de tratamiento +/-SEM. El por ciento de mejora en el umbral de dolor (sobre el último umbral de dolor pre-tratamiento) fue mayor en el grupo de LIPINOVA alto durante las cuatro semanas de tratamiento e incrementó gradualmente con el tiempo, mostrando mejora >50 % en la semana 4. Aunque la mejora fue evidente en los controles y en el grupo de dosis baja de LIPINOVA, estos valores fueron más bajos que en el grupo de LIPINOVA alto, y las diferencias entre la dosis baja de LIPINOVA y los controles fueron marginales. B) Los datos se grafican como una gráfica de caja y bigotes. Cada punto representa el valor de un ratón individual, en tanto que la X representa la mediana. La caja representa el cuartil superior e inferior, en tanto que los bigotes muestran los valores máximo y mínimo. Esta visualización muestra que las medianas son consistentemente más altas para el grupo de LIPINOVA alto y en la semana 4 la mediana en el grupo de simulación está sesgada por unos pocos ratones con valores de umbral particularmente altos esa semana.

65 Las figuras 18A y 18B son diagramas que muestran el por ciento de línea de base durante cuatro semanas de tratamiento. A) Los datos se grafican como el por ciento de umbral medio para cada grupo de tratamiento +/-SEM.

El por ciento de las puntuaciones de línea de base pre-dolor fueron mayores en el grupo de LIPINOVA alto durante las cuatro semanas de tratamiento y alcanzaron el valor de recuperación (para todo el grupo) en la semana 4. Aunque fue evidente cierta recuperación en las puntuaciones de línea de base en los controles y en el grupo de dosis baja de LIPINOVA, estos valores fueron más bajos que en el grupo de LIPINOVA alto, y las diferencias entre la dosis baja de LIPINOVA y los controles fueron marginales. B) Los datos se grafican como una gráfica de caja y bigotes. Cada punto representa el valor de un ratón individual, en tanto que la X representa la mediana. La caja representa el cuartil superior e inferior, en tanto que los bigotes muestran los valores máximo y mínimo. Esta visualización muestra que las medianas son consistentemente más altas para el grupo de LIPINOVA alto y en la semana 4 la mediana en el grupo de simulación está sesgada por unos pocos ratones con valores de umbral particularmente altos esa semana.

La figura 19 es un diagrama que muestra que los ratones se recuperan con el paso del tiempo con el tratamiento. Se consideró que los ratones se habían recuperado si volvían a al menos 70 % de su umbral de línea de base durante dos semanas consecutivas. En el eje x, la semana denota la semana de estudio; la semana 1 representa la primera semana de tratamiento. Los ratones comenzaron a recuperarse tan pronto como en la semana 2 en los grupos de LIPINOVA. Para la semana 5, la mayoría de los ratones se habían recuperado en el grupo de dosis alta de LIPINOVA, en tanto que solo 2 se recuperaron en el grupo de dosis baja y 1 en cada uno de los grupos de simulación y placebo. Durante la fase 3 (retiro), algunos ratones más se recuperaron en los grupos de dosis baja, placebo y simulación, y ningún ratón mostró una disminución en el umbral de dolor durante el período de retiro. Durante el retiro, se recuperó un mayor número de ratones en los grupos de dosis baja versus placebo y simulación. Durante la fase 4 (terapia de combinación), todos los ratones se recuperaron de manera natural, lo que impidió valorar los efectos del tratamiento durante esta fase. n = 12 grupos de dosis alta y baja, n = 11 placebo y simulación.

La figura 20 es un diagrama que muestra el por ciento de valores de umbral de línea de base. Los valores se presentan en el % medio del valor de umbral de línea de base para todos los ratones en el grupo +/- SEM. El % de las puntuaciones de línea de base fueron consistentemente más altas en el grupo de dosis alta de LIPINOVA. n = 12 grupos de dosis alta y baja, n = 11 grupo de placebo y simulación.

La figura 21 es un diagrama que muestra el por ciento de mejora durante las primeras tres semanas de tratamiento. Los valores se presentan como % medio de mejora para todos los ratones en el grupo +/- SEM. El % de las puntuaciones de mejora fueron consistentemente más altas en el grupo de dosis alta de LIPINOVA. n = 12 grupos de dosis alta y baja, n = 11 grupo de placebo y simulación.

Las figuras 22A y 22B son diagramas que muestran los niveles de PGE₂ a lo largo de la inducción y tratamiento. El panel A representa los niveles promedio de PGE₂ +/-SEM para todos los ratones durante el período de inducción. En el panel A, donde hay un mayor número de puntos de datos para promediar (46 ratones), el SEM se reduce en comparación con el panel B, donde solo se promedian los ratones para cada grupo (11-12 ratones). El panel B representa los valores de PGE₂ en línea de base, a niveles pico (3 semanas), después de que se completaron todas las inyecciones y entonces a intervalos de 2 semanas durante la fase de tratamiento. Los valores de SEM se superponen y no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos, aunque el grupo de LIPINOVA alto parece tener niveles más bajos de PGE₂ durante el tratamiento. n = 12 grupos de dosis alta y baja, n = 11 grupo de placebo y simulación.

Las figuras 23A y 23B son diagramas que muestran que seis SPM son efectivos al reducir la producción de IL-6 y PGE₂ a partir de fibroblastos cuando se usan como pre-tratamiento y post-tratamiento. Los fibroblastos vestibulares o vulvares del paciente se pretrataron durante 18 h con resolvina D₃ (RvD₃), resolvina D₄ (RvD₄), resolvina D₅ (RvD₅), resolvina E₁ (RvE₁), protectina D1 o protectina DX a una concentración de 5 nM, se pretrataron nuevamente durante 30 min antes de la activación, entonces se activaron con 10 pg/ml de IL-1β durante 48 h con una dosis de SPM de refuerzo a las 24 h. Los medios de cultivo se recolectaron y analizaron para IL-6 (Panel A) y PGE₂ (Panel B). Media +/- SEM de n = 6 (dos casos ejecutados por triplicado), ANOVA *p < 0,05 versus solo activación (IL-1b). Todos los SPM probados mostraron eficacia en la reducción de la producción de IL-6 y PGE₂ cuando se usó un pretratamiento (antes del inicio de inflamación).

Las figuras 24A y 24B son diagramas que muestran que seis SPM son efectivos al reducir la producción de IL-6 y PGE₂ a partir de fibroblastos cuando se usan como un post-tratamiento. Los fibroblastos vestibulares o vulvares de paciente se activaron primero con IL-1β durante 30 min, entonces se trataron con RvD₃, RvD₄, RvD₅, RvE₁, protectina D1 o protectina DX a una concentración de 5 nM durante 18 horas, seguido por una dosis de SPM de refuerzo durante 24 h. Los medios de cultivo se recolectaron y analizaron para contenido de IL-6 (Panel A) y PGE₂ (Panel B). Media +/- SEM de n = 6 (dos casos ejecutados por triplicado), ANOVA *p < 0,05 versus solo activación (IL-1b). Todos los SPM probados mostraron eficacia en la reducción de la producción de IL-6 y PGE₂, incluso después de que se hubiera iniciado la inflamación, que sugiere que estos SPM serían efectivos incluso en presencia de inflamación continua. La magnitud de la reducción no fue tan grande como antes del tratamiento, pero igualmente significativa como la reducción de los regímenes de pre-tratamiento.

Descripción detallada de la invención

Esta invención se basa, al menos en parte, en descubrimientos inesperados de que los fibroblastos aislados y cultivados de sitios de dolor en pacientes con LPV producen niveles muy altos de mediadores proinflamatorios y pro-dolor en comparación con sitios "sin dolor" y que una clase de moléculas llamadas mediadores pro-resolutivos son efectivos contra LPV.

La LPV es la causa más común de dispareunia de larga data (relaciones sexuales dolorosas) en mujeres premenopáusicas, caracterizada por dolor al tacto ligero limitado al vestíbulo vulvar que rodea la abertura vaginal. En las mujeres con LPV, el dolor vestibular crónico es paralizante, afecta todos los aspectos de la vida y exacerba las comorbilidades, tal como fibromialgia y dolor de vejiga. El impacto devastador de LPV incluye disfunción sexual, infertilidad, depresión e incluso suicidio. Sin embargo, la etiología de LPV no está clara y no existe una terapia médica efectiva. Esta invención aborda esta necesidad insatisfecha.

Como se divulga en la presente, se descubrió que el vestíbulo vulvar expresa un perfil inflamatorio único que implica la producción elevada de mediadores pro-dolor y proinflamatorios, por ejemplo, prostaglandina E₂ (PGE₂) e interleucina-6 (IL-6) por cepas de fibroblastos aisladas del sitio de vestíbulo (figura 1, "Vestíbulo"). Además, la liberación elevada de mediadores proinflamatorios se correlaciona con los perfiles de dolor en mujeres. Por lo tanto, un producto terapéutico efectivo para LPV reduciría idealmente la señalización proinflamatoria, en tanto que conservaría la capacidad natural de estas células para responder a estímulos proinflamatorios dañinos. La investigación descrita en la presente ha identificado mecanismos por los cuales la hipersensibilidad a ciertos estímulos inflamatorios conduce a mayor dolor. Específicamente, se demostró que el dolor en pacientes con LPV se correlaciona directamente con la producción de mediadores proinflamatorios y pro-dolor a partir de fibroblastos cultivados a partir de biopsias de sitios dolorosos (figura 1, "Vestíbulo").

Como se describe en la presente, los fibroblastos que producen altos niveles de mediadores pro-dolor y proinflamatorios se pueden aislar de pacientes en sitios con dolor intenso y cuantificable. Como producen abundantemente mediadores pro-dolor y mantienen sus fenotipos relevantes en cultivo, los fibroblastos vestibulares primarios son valiosos en el modelado de LPV y se usaron de manera exitosa aquí para identificar nuevos agentes terapéuticos que se pueden usar para resolver la producción de mediadores inflamatorios atípicos en pacientes con LPV que conduce a dolor regional. Los agentes terapéuticos identificados incluyen mediadores pro-resolutivos.

Mediadores pro-resolutivos

Como se usa en la presente "mediador pro-resolutivo" se refiere a un compuesto o mezcla como se define en las reivindicaciones.

En aspectos que no se abarcan por la redacción de las reivindicaciones, un "mediador pro-resolutivo" incluye un compuesto o sustancia derivado de lípidos que promueve la resolución de inflamación, por ejemplo, puede reducir un signo o síntoma de inflamación en una célula u organismo. En otros aspectos que no se abarcan por la redacción de las reivindicaciones, los mediadores pro-resolutivos incluyen una clase de lípidos llamados "mediadores pro-resolutivos especializados" (SPM), sus precursores, mezclas de diferentes SPM, mezclas de diferentes precursores de SPM y mezclas de SPM y precursor de SPM.

Los SPM representan una clase de lípidos pro-resolutivos, anti-dolor y antiinflamatorios derivados naturalmente de ácidos grasos omega-3 y omega-6 (ver, por ejemplo, figura 2) que ayudan a curación sin comprometer la capacidad del cuerpo para defenderse contra agresiones inflamatorias (por ejemplo, infección o lesión).⁵⁻⁷ Los SPM son un género con varias familias de potentes productos bioactivos endógenos derivados de precursores de ácidos grasos esenciales EPA, DHA, ácido araquidónico (ARA) y ácido docosapentaenoico (DPA) que se biosintetizan por incorporación posicional y estereoespecífica de una, dos o tres moléculas de oxígeno molecular en un ácido graso poliinsaturado (PUFA) usando EPA, DHA, ALA y DPA como sustratos en una reacción catalizada que implica lipoxigenasas de ácidos grasos, ciclooxigenasa tipo 2, cuando se acetila por aspirina, y varias citocromo P450 oxidasas.

El término "mediador pro-resolutivo especializado" o SPM se refiere a un derivado enzimáticamente oxigenado derivado de PUFA que tiene una potente actividad antiinflamatoria y activadora de resolución y que actúa como regulador endógeno de la respuesta inflamatoria para devolver un tejido inflamado a su estado no inflamado y sano. Los SPM actúan como ligandos de receptores endógenos o moduladores alostéricos para activar potentemente las respuestas celulares que activan presuntamente las acciones antiinflamatorias y aceleran, estimulan y desencadenan la resolución de inflamación. El término "precursor de SPM" se refiere a un derivado enzimáticamente oxigenado de un PUFA que requiere una reacción enzimática adicional para convertirlo en un SPM. Un precursor de SPM es un sustrato más próximo para la formación endógena de un SPM que el sustrato de PUFA correspondiente en sí mismo.

Los SPM incluyen varias familias de mediadores, lipoxinas, resolvinas (por ejemplo, las series E y D), protectinas y maresinas. Los ejemplos de SPM incluyen resolvina E1 (RvE1; ácido 5S,12,18-trihidroxi-eicosa-6Z,8E,10E,14Z,16E-pentaenoico), 18S-resolvina E1 (18S-RvE1; ácido 5S, 12R, 18S-trihidroxi-eicosa-6Z,8E, 10E,

14Z, 16E-pentaenoico), 20-hidroxi-RvE1 (ácido 5S,12R,18R,20-tetrahidroxi-eicosa-6Z,8E,10E,14Z,16E-pentaenoico), resolvina E2 (RvE2; ácido 5S,18-dihidroxi-eicosa-6E,8Z,11Z,14Z,16E-pentaenoico), resolvina E3 (RvE3; ácido 17,18R-dihidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,13E,15E-pentaenoico), 18S-resolvina E3 (18S-RvE3; ácido 17,18S-dihidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,13E,15E-pentaenoico), ácido 17,18-epoxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,13E,15E-pentaenoico, lipoxina As (LXA₅; ácido 5S,6R,15S-trihidroxi-eicosa-7E,9E,11Z,13E,17Z-pentaenoico), 15-epi-lipoxina A5 (LXA₅; 5S,6R,15R-trihidroxi-eicosa-7E,9E,11Z,13E,17Z-ácido pentaenoico), maresina 1 (MaR1; ácido 7R,14S-docosa-4Z,8E,10E,12Z,16Z,19Z-hexaenoico), 7S-maresina 1 (7S-MaR1; ácido 7S,14S-docosa-4Z,8E,10E,12Z,16Z,19Z-hexaenoico), 7S,14S-diHDHA (ácido 7S,14S-dihidroxi-docosa-4Z,8E,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico), protectina D1 (PD1; ácido 10R,17S-dihidroxi-docosa-4Z, 7Z, 11E, 13E, 15Z, 19Z-ácido hexaenoico), 10S,17S-HDHA (ácido 10S,17S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-hexaenoico), 14S,21 S-diHDHA (ácido 14S,21 S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z, 12E, 16Z, 19Z-hexaenoico), 14S,21R-diHDHA (ácido 14S,21R-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico), 14R,21 S-diHDHA (ácido 14R,21 S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico), 14R,21 R-diHDHA (ácido 14R,21 R-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico), 13 S,14S-epoxi-DHA (ácido 13 S,14S-epoxi-docosa-4Z,7Z,9E,11E,16Z,19Z-hexaenoico), 16,17S-diHDHA (ácido 16,17S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,14E,19Z-hexaenoico), 16,17-epoxi-DHA (ácido 16,17-epoxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,14E,19Z-hexaenoico), resolvina D1 (RvD1; ácido 7S,8R,17S-trihidroxi-docosa-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-hexaenoico), resolvina D2 (RvD2; 7S,16R,17S-trihidroxi-docosa-4Z,8E,10Z,12E,14E,19Z-ácido hexaenoico), resolvina D3 (RvD3; 4S,11R,17S-trihidroxi-docosa-5Z,7E,9E, 13Z, 15E, 19Z-ácido hexaenoico), resolvina D4 (RvD4; 4S,5,17S-trihidroxi-docosa-6E,8E,10Z,13Z,15E,19Z-ácido hexaenoico), resolvina D5 (RvD5; 7S,17S-dihidroxi-docosa-5Z,8E,10Z,13Z,15E,19Z-ácido hexaenoico), resolvina D6 (RvD6; 4S,17S-dihidroxi-docosa-5E,7Z,10Z,14Z,16E,19Z-ácido hexaenoico), D1 de resolución activada por aspirina (AT-RvD1; ácido 7S,8R,17R-trihidroxi-docosa-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-hexaenoico), resolvina D2 activada por aspirina (AT-RvD2; ácido 7S,16R,17R-trihidroxi-docosa-4Z,8E,10Z,12E,14E,19Z-hexaenoico), resolvina D3 activada por aspirina (AT-RvD3; ácido 4S,11,17R-trihidroxi-docosa-5Z,7E,9E,13Z, 15E, 19Z-hexaenoico), resolvina D4 activada por aspirina (AT-RvD4; ácido 4S,5,17R-trihidroxi-docosa-6E,8E,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico), resolvina D5 activada por aspirina (AT-RvD5; ácido 7S,17R-dihidroxi-docosa-5Z,8E,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico), resolvina D6 activada por aspirina (AT-RvD6; ácido 4S,17R-dihidroxi-docosa-5E,7Z,10Z,14Z,16E,19Z-ácido hexaenoico), 7S,17S-diHDPA n-3 (ácido 7S,17S-dihidroxi-docosa-8E,10Z,13Z,15Z,19Z-pentaenoico (ω -3)), lipoxina A₄ (LXA₄; ácido 5S,6R,15S-trihidroxi-eicosa-7E,9E,11Z,13E-tetraenoico), 15-epi-lipoxina A₄ (15-epi-LXA₄; ácido 5S,6R,15R-trihidroxi-eicosa-7E,9E, 11Z, 13E-tetraenoico), delta 12-prostaglandina J₂ (delta12-PGJ₂; ácido 11-oxo-15S-hidroxi-prosta-SZ,9,12E-trienoico), 15-desoxi-delta12,14-prostaglandina J₂ (15-desoxi-delta12,14-PGJ₂; ácido 11-oxo-prosta-5Z,9,12E,14E-tetraenoico), ácido 11(12)-epoxi-eicosatetraenoico (11(12)-EpETE; ácido 11(12)-epoxi-eicosa-5Z,8Z, 14Z, 17Z-tetraenoico), ácido 17(18)-epoxi-eicosatetraenoico (17(18)-EpETE; ácido 17(18)-epoxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,14Z-tetraenoico), ácido 19(20)-epoxi-docosapentaenoico (19(20)-EpDPE; ácido 19(20)-epoxi-docosa-4Z,7Z,10Z, 13Z,16Z-pentaenoico), 10S,17S-HDPA n-6 (ácido 10S,17S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,15E-pentaenoico), 7,17-HDPA n-6 (ácido 7,17-dihidroxi-docosa-4Z,8E,10Z,13Z,15E-pentaenoico), 7,14-HDPA n-6 (ácido 7,14-dihidroxi-docosa-4Z,8E,10Z,12Z,16Z-pentaenoico), 10S,17S-HDPA n-6 (ácido 10S,17S-dihidroxi-docosa-7Z,11E,13Z,15E,19Z-pentaenoico) y/o 7, 17-HDPA n-6 (ácido 7,17-dihidroxi-docosa-8E,10Z,13Z,15E,19Z-pentaenoico).

Los ejemplos de precursores de SPM incluyen 5S-HEPE (ácido 5S-hidroxi-eicosa-6E,8Z,11Z,14Z,17Z-pentaenoico); 11S-HEPE (ácido 11S-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,12E,14Z,17Z-pentaenoico); 12S-HEPE (ácido 12S-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-pentaenoico); 12R-HEPE (ácido 12R-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-pentaenoico); 15S-HEPE (ácido 15S-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,13E,17Z-pentaenoico); 4S-HDHA (ácido 4S-hidroxi-docosa-5E,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-hexaenoico); 7S-HDHA (ácido 7S-hidroxi-docosa-4Z,8E,10Z,13Z,16Z,19Z-hexaenoico); 10S-HDHA (ácido 10S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,16Z,19Z-hexaenoico); 11S-HDHA (ácido 11S-hidroxi-docosa-4Z, 7Z, 9E, 13 Z, 16Z, 19Z-hexaenoico); 14S-HDHA (ácido 14S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico); 14R-HDHA (ácido 14R-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico); 20S-HDHA (ácido 20S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-hexaenoico); 17S-HDPAn-6 (ácido 17S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,15E-pentaenoico); 14S-HDPAn-6 (ácido 14S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z-pentaenoico); 10S-HDPAn-6 (ácido 10S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,16Z-pentaenoico); 17S-HDPAn-3 (ácido 17S-hidroxi-docosa-7Z,10Z,13Z,15E,19Z-pentaenoico); 14S-HDPAn-3 (ácido 17S-hidroxi-docosa-7Z,10Z,12E,16Z,19Z-pentaenoico); 10S-HDPAn-6 (ácido 10S-hidroxi-docosa-7Z,11E,13Z,16Z,19Z-pentaenoico); 15S-HETE (ácido 15S-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,13E-tetraenoico); y/o 15R-HETE (ácido 15R-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,13E-tetraenoico).

De acuerdo con la invención, el mediador pro-resolutivo se puede (1) seleccionar del grupo que consiste en resolvina D2, resolvina D3, resolvina D4, resolvina D5, resolvina E1, maresina-1, epi-maresina-1, lipoxina A4, protectina D1, protectina DX y DHA; o (2) una mezcla que comprende DHA, 14-HDHA, 17-HDHA y 18-HEPE,

Otros ejemplos, presentes solo para propósitos ilustrativos, de mediador pro-resolutivo incluyen, pero no se limitan a una resolvina; resolvina D₁; resolvina D₆; resolvina activada por aspirina; resolvina D₁ activada por aspirina; protectina D1; 17-HDHA; 14-HDHA; 13-HDHA; 7-HDHA; 4-HDHA; una lipoxina; un análogo de lipoxina; lipoxina A₄; un análogo de lipoxina A₄; lipoxina B₄; ácido 5,15-dihidroxi-eicosatetraenoico; tromboxano B₂; ácido 15-hidroxi-eicosatetraenoico (HETE); 12-HETE; 11-HETE; 5-HETE; resolvina Es (por ejemplo, resolvina E1, 18S-resolvina E1, 20-hidroxi-resolvina E1, resolvina E2, 18S-resolvina E3.); lipoxina A₅; lipoxina B₅; ácido 5,15-

dihidroieicosapentaenoico; ácido 18-hidroxieicosapentaenoico (HEPE); 15-HEPE; 12-HEPE; 5-HEPE; anexina A1; un agente multi-región que tiene una región de lipoxina (ver patente de Estados Unidos No. 5,441,951); mediadores lipídicos activados por aspirina, mediadores lipídicos activados por aspirina (ω -3); 16-dimetil-LXA₄; 15-epi-LXA₄; análogos de benzo-LXA₄; 9 (o-[9,12]-benzo-15-epi-LXA(4) metil éster; y análogos o miméticos de los mismos. Estos mediadores y métodos para producirlos se describen en, por ejemplo, patente de Estados Unidos Núm. 7,615,576; 5,441,951; 6,887,901; 7,737,178; 7,595,341; 7,378,444; 7,585,856; 6,703,423; 7,700,650; 7,812,054; 7,132,451; publicaciones de patente de Estados Unidos 2010/0105772; 2010/0105773; 2009/0156673; 2006/0293288; 2003/0166716, 2008/0312323, 20140079631, 20150126602, 20180200375, y 2018/0256597; y Serhan et al. FASEB Journal 2012 26.

Ciertos SPM y precursores de SPM se encuentran en aceites derivados de fuentes naturales tal como peces, crustáceos (kril), algas (algas productoras de PUFA de cadena larga ω -3), moluscos y de otros organismos que contienen PUFA de cadena larga ω -3. Estos aceites y sus fracciones que contienen o se enriquecen con uno o más de los SPM o precursores de SPM como se define en las reivindicaciones también se pueden usar en esta invención. Los SPM y los precursores de SPM pueden derivar de cualquiera de los siguientes PUFA omega-3 u PUFA omega-6: Ácido hexadecatrienoico (HTA), ácido α -linolénico (ALA), ácido estearidónico (SDA), ácido nonadecatetraenoico, ácido eicosatrienoico, ácido eicosatetraenoico, ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido heneicosapentaenoico, ácido docosapentaenoico (DPA), ácido docosahexaenoico (DHA), ácido tetracosapentaenoico y ácido tetracosahexaenoico. Estos ácidos grasos pueden dar lugar a precursores de SPM y SPM a través de oxigenación enzimática.

En aspectos no abarcados por la redacción de las reivindicaciones, los mediadores pro-resolutivos también incluyen, además de los SPM y precursores de SPM listados anteriormente, otros derivados mono-, di- y trihidroxilados y epoxigenados de los ácidos grasos poliinsaturados mencionados anteriormente, que poseen actividades antiinflamatorias y pro-resolutivas. Se puede encontrar que estos derivados están presentes y enriquecidos en aceites obtenidos de organismos que contienen PUFA ω -3 de cadena larga que incluyen peces, crustáceos, algas, moluscos y organismos marinos, plantas, organismos microbianos, así como organismos transgénicos dotados de la capacidad enzimática para formar PUFA ω -3 de cadena larga. Del mismo modo, se pueden identificar y enriquecer precursores adicionales de SPM conocidos y SPM novedosos en estos aceites. Además, los SPM y los precursores de SPM pueden estar presentes como ésteres y amidas. Los ésteres pueden ser ésteres naturales tal como triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y fosfolípidos, así como ésteres preparados durante los procesos industriales comúnmente empleados en la industria de aceite de pescado que permiten la concentración de EPA y DHA a partir de aceites de pescado crudos y refinados, en particular la forma de ésteres etílicos.

Cualquier SPM, precursor de SPM o mezclas de SPM y precursores de SPM que se encuentran en aceites obtenidos de organismos que contienen PUFA ω -3 de cadena larga se pueden enriquecer o concentrar empleando métodos de extracción y separación conocidos en la técnica. Los ejemplos incluyen tecnologías de destilación y tecnologías de fraccionamiento cromatográfico y separación.

Los mediadores pro-resolutivos de esta invención tal como SPM resuelven la inflamación y dolor sin afectar la defensa normal de hospedador. La resolución de la inflamación y dolor, que alguna vez se pensó que era un proceso pasivo durante el cual la señalización proinflamatoria disminuye, ahora se conoce que es un proceso activo mediado por los SPM. Los SPM reducen activamente la señalización proinflamatoria, promueven la depuración de bacterias, reducen el dolor y aceleran la cicatrización de heridas. Los SPM se pueden producir de manera natural por el cuerpo humano, prácticamente no tienen toxicidad, y varios están en ensayo clínico para otras afecciones. Los SPM no son agentes antiinflamatorios tradicionales y no son inmunosupresores; no afectan la capacidad del cuerpo para detectar y responder a infecciones o lesiones.

Como se divulga en la presente, los mediadores pro-resolutivos pueden ser agentes terapéuticos ideales para LPV, ya que fomentan la cicatrización de heridas, promueven la depuración de bacterias y reducen el dolor y señalización proinflamatoria. Aunque los SPM no se han probado clínicamente como una terapia de LPV, la evidencia presentada aquí respalda que los mediadores pro-resolutivos son eficaces para reducir la producción de mediadores proinflamatorios que provocan dolor y a su vez, reducir el dolor asociado a LPV *in vivo*.

Los mediadores pro-resolutivos, que incluyen moléculas tal como los SPM producidos de manera natural por el cuerpo humano, promueven la depuración de bacterias, reducen el dolor y aceleran la cicatrización de heridas. Usando un modelo *in vitro* descrito en la presente, los inventores identificaron varios SPM (tal como resolvina D₂, maresina-1, epi-maresina-1 y lipoxina A₄) altamente efectivos en la reducción de la producción de IL-6 y PGE₂ en células cuando se administran antes de la estimulación inflamatoria. Además, al menos dos de estos SPM (maresin-1 y lipoxina A₄) son altamente efectivos en la reducción de IL-6 y PGE₂ en células ya activadas, lo que sugiere que son efectivos a lo largo de todo el proceso de enfermedad. Además, se encontró que la suplementación de fibroblastos con precursor de SPM, ácido docosahexaenoico, también redujo la señalización proinflamatoria y apoyó la producción de los SPM, detectada por análisis lipídico dirigido. Los resultados descritos en la presente sugieren que los SPM o sus precursores son terapias de LPV efectivas.

Como también se divulga en la presente, se desarrolló un modelo de ratón robusto y reproducible de LPV para valorar la intervención terapéutica contra el dolor vulvar (el primero de su tipo). El modelo combina la cuantificación de mediadores proinflamatorios en tiempo real con pruebas de dolor mecánico mediante un dispositivo electrónico de von Frey para monitorear el dolor e inflamación con el paso del tiempo. Los inventores fueron capaces de establecer una alodinia estable en ratones, que duró más de varios meses. Durante la inducción de alodinia, se encontró que los umbrales de dolor disminuyeron, en tanto que los niveles de mediadores proinflamatorios (por ejemplo, PGE₂) incrementaron dentro de los líquidos vulvovaginales recolectados, lo que concuerda los descubrimientos *in vitro*. Entonces, los inventores trataron a los ratones diariamente con maresina-1 o DHA tópico, que incrementó los umbrales de dolor, en tanto que suprime los niveles de PGE₂. Los descubrimientos *in vitro* e *in vivo* divulgados en la presente sugieren que la aplicación tópica de SPM puede reducir el dolor e inflamación vulvar y representaría una terapia ideal para LPV.

Formulaciones y usos

El mediador pro-resolutivo de la invención es para usarse en un método para reducir o prevenir la irritación del tracto genital inferior en un sujeto mujer, el método que comprende administrar una cantidad efectiva del mediador pro-resolutivo de manera tópica a un sitio de tratamiento del tracto genital inferior del sujeto, donde la irritación se asocia con una condición inflamatoria del tracto genital seleccionada del grupo que consiste en vulvodinia provocada localizada (LPV), liquen plano, liquen escleroso, vaginitis inflamatoria descamativa, vulvovaginitis atrófica asociada con cáncer de mama y prurito crónico.

En aspectos no abarcados por la redacción de las reivindicaciones, los compuestos de mediadores pro-resolutivos descritos anteriormente y composiciones relacionadas son útiles en métodos para tratar diferentes trastornos o condiciones inflamatorias, tal como una irritación asociada con inflamación. Con ese fin, el primer indicador encontrado de riesgo incrementado de desarrollo de vulvodinia es el reconocimiento de una mujer de dolor/irritación prolongada después de relaciones sexuales (Reed BD, et al., Journal of Women's Health 2012;21:1139-43). Por lo tanto, los compuestos de mediadores pro-resolutivos descritos anteriormente y composiciones relacionadas se pueden usar como una realización de prevención primaria del desarrollo de vulvodinia si se aplica por mujeres cuando reconocen esto como un problema.

Los compuestos o composiciones de la invención se administran de manera tópica. En aspectos no abarcados por la redacción de las reivindicaciones, los compuestos o composiciones se pueden administrar en una cantidad terapéuticamente efectiva por cualquiera de los modos aceptados de administración. Los intervalos de dosis adecuados dependen de numerosos factores tal como la severidad de la enfermedad que se va a tratar, la edad y salud relativa del sujeto, la potencia del compuesto usado, la vía y forma de administración, la indicación hacia la cual se dirige la administración y las preferencias y experiencia del profesional médico implicado. Un experto en la técnica de tratamiento de estas enfermedades será capaz, sin experimentación indebida y confiando en el conocimiento personal y la divulgación de esta solicitud, de determinar una cantidad terapéuticamente efectiva de los compuestos de mediadores pro-resolutivos de la presente divulgación para una enfermedad dada. Por lo tanto, los compuestos o composiciones de la presente divulgación se pueden administrar como formulaciones farmacéuticas que incluyen aquellas adecuadas para administración tópica, vaginal, oral (incluida bucal y sublingual), rectal, nasal, pulmonar o parenteral (incluida intramuscular, intraarterial, intratecal, subcutánea e intravenosa) o en una forma adecuada para administración por inhalación o insuflación. En ciertos aspectos, la forma de administración es tópica, vaginal o transdérmica usando un régimen de dosis diaria conveniente que se puede ajustar de acuerdo con el grado de aflicción.

En particular, se prefiere el tratamiento tópico y/o transdérmico usando los compuestos o composiciones para el control local de estados de enfermedad y estados de cascada inflamatoria para reducir o prevenir el dolor del tracto genital inferior en un sujeto, tal como LPV, en tanto que se asegura que cualquier efecto secundario no deseado se reduzca al mínimo y restrinja.

Con ese fin, las composiciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden ser adecuadas para administración tópica. En ese caso, las composiciones farmacéuticas comprenden uno o más mediadores pro-resolutivos, un portador tópico farmacéuticamente aceptable y opcionalmente un intensificador de permeación. En algunos aspectos, el intensificador de permeación puede comprender una base. La base puede estar presente a una concentración suficiente para proporcionar un pH de formulación en el intervalo de aproximadamente 7,5 a 13,0. La composición farmacéutica puede ser acuosa. La composición farmacéutica acuosa puede ser una crema, gel, loción, pasta o solución.

Diferentes agentes intensificadores de permeación de piel se conocen en la técnica y se pueden usar en esta invención. Los ejemplos de intensificadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, éteres tal como éter monoetilico de dietilenglicol (disponible comercialmente como TRANSCUTOL) y éter monometílico de dietilenglicol; agentes tensioactivos tal como laurato de sodio, lauril sulfato de sodio, bromuro de cetiltrimetilamonio, cloruro de benzalconio, poloxámero (231, 182, 184), Tween (20, 40, 60, 80) y lecitina (patente de Estados Unidos No. 4,783,450); alcoholes tal como etanol, propanol, octanol, alcohol bencílico y similares; polietilenglicol y ésteres del mismo tal como monolaurato de polietilenglicol (PEGMI; ver, por ejemplo, patente de Estados Unidos No.

4,568,343); amidas y otros compuestos nitrogenados tal como urea, dimetilacetamida (DMA), dimetilformamida (DMF), 2-pirrolidona, 1-metil-2-pirrolidona, etanolamina, dietanolamina y trietanolamina; terpenos; alcanonas; y ácidos orgánicos, en particular ácido cítrico y ácido succínico. También se pueden usar AZONE® y sulfóxidos tal como DMSO y C₁₀ MSO.

Otros intensificadores adecuados incluyen aquellos co-intensificadores lipófilos habitualmente referidos como intensificadores "plastificantes", es decir, intensificadores que tienen un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 150 a 1000, una solubilidad acuosa de menos de aproximadamente 1 % en peso, preferentemente menos de aproximadamente 0,5 % en peso, y más preferentemente menos de aproximadamente 0,2 % en peso. El parámetro de solubilidad de Hildebrand de los intensificadores plastificantes está en el intervalo de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 10, preferentemente en el intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 10. Estos intensificadores se describen en, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 6,586,000, y WO 01/43775. Los intensificadores lipófilos preferidos son ésteres grasos, alcoholes grasos y éteres grasos. Los ejemplos de ésteres de ácidos grasos específicos y más preferidos incluyen laurato de metilo, oleato de etilo, monolaurato de propilenglicol, dilaurato de propilenglicol, monolaurato de glicerol, monooleato de glicerol, n-decanoato de isopropilo y miristato de octildodecilo. Los alcoholes grasos incluyen, por ejemplo, alcohol estearílico y alcohol oleílico, en tanto que los éteres grasos incluyen compuestos donde un diol o triol, preferentemente un alcanodiol o triol de C₂-C₄, se sustituyen con uno o dos sustituyentes de éter graso. Los intensificadores de permeación adicionales se conocen en la técnica de administración tópica de fármacos. Ver, por ejemplo, Percutaneous Penetration Enhancers, Smith et al., editores (CRC Press, 1995).

Una formulación descrita en la presente puede estar en cualquier forma adecuada para aplicación tópica, por ejemplo, a la piel (por ejemplo, la vulva externa, vestíbulo o vagina) y tejidos circundantes. Puede comprender, por ejemplo, una crema, loción, solución, gel, ungüento, pasta, venda, pintura, bioadhesivo o similares, y/o se puede preparar para contener liposomas, micelas y/o microesferas. Esta formulación puede ser acuosa, es decir, contener agua, o puede ser no acuosa y usarse opcionalmente en combinación con una sobrecapa oclusiva de tal forma que la humedad que se evapora de la superficie corporal se mantenga dentro de la formulación tras la aplicación a la superficie corporal y posteriormente.

Las formulaciones de la invención pueden contener opcionalmente un intensificador de viscosidad y/o formador de película farmacéuticamente aceptable. Un intensificador de viscosidad incrementa la viscosidad de la formulación para inhibir su propagación más allá del sitio de aplicación. El abeto balsámico (Oregón) es un ejemplo de un intensificador de viscosidad farmacéuticamente aceptable. Un formador de película, cuando se seca, forma una película protectora sobre el sitio de aplicación. La película inhibe la remoción del principio activo y lo mantiene en contacto con el sitio que se está tratando. Un ejemplo de un formador de película que es adecuado para usarse en esta invención es colodión flexible, USP. Como se describe en Remington, The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed. (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995), en la página 1530, los colodiones son soluciones de éter etílico/etanol que contienen piroxilina (una nitrocelulosa) que se evaporan para dejar una película de piroxilina. Un formador de película puede actuar adicionalmente como un portador. Las soluciones que se secan para formar una película algunas veces se refieren como pinturas.

Los ungüentos, como se conoce en la técnica de la formulación farmacéutica, son preparaciones semisólidas que se basan habitualmente en petrolato u otros derivados de petróleo. La base de ungüento específica que se va a usar, como se apreciará por aquellos expertos en la técnica, es una que proporcionará una administración de fármaco óptima y, preferentemente, proporcionará también otras características deseadas, por ejemplo, emoliencia o similares. Al igual que con otros portadores o vehículos, una base de ungüento debe ser inerte, estable, no irritante y no sensibilizante. Como se explica en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Ed. (Easton, Pa.: Mack Publishing Co., 1995), en las páginas 1399-1404, las bases de ungüento se pueden agrupar en cuatro clases: bases oleaginosas; bases emulsionables; bases de emulsión; y bases solubles en agua. Las bases de ungüento oleaginosas incluyen, por ejemplo, aceites vegetales, grasas obtenidas de animales e hidrocarburos semisólidos obtenidos de petróleo. Las bases de ungüento emulsionables, también conocidas como bases de ungüento absorbentes, contienen poca o nada de agua e incluyen, por ejemplo, sulfato de hidroxistearina, lanolina anhidra y petrolato hidrófilo. Las bases de ungüento en emulsión son emulsiones de agua en aceite (W/O) o emulsiones de aceite en agua (O/W) e incluyen, por ejemplo, alcohol cetílico, monoestearato de glicerilo, lanolina y ácido esteárico. Las bases de ungüento solubles en agua preferidas se preparan a partir de polietilenglicoles de peso molecular variable; de nuevo, ver Remington: The Science and Practice of Pharmacy for further information.

Las cremas, como también se conoce bien en la técnica, son líquidos viscosos o emulsiones semisólidas, ya sea aceite en agua o agua en aceite. Las bases de crema son lavables con agua y contienen una fase oleosa, un emulsionante y una fase acuosa. La fase oleosa, también llamada fase "interna", en general se compone de petrolato y un alcohol graso tal como alcohol cetílico o estearílico. La fase acuosa usualmente, aunque no necesariamente, excede la fase oleosa en volumen, y en general contiene un humectante. El emulsionante en una formulación de crema es en general un agente tensioactivo no iónico, aniónico, catiónico o anfótero.

Como se apreciará por aquellos que trabajan en el campo de la formulación farmacéutica, los geles son sistemas

semisólidos de tipo suspensión. Los geles de una sola fase contienen macromoléculas orgánicas distribuidas de manera sustancialmente uniforme en todo el líquido portador, que es habitualmente acuoso, pero también, preferentemente, contiene un alcohol y, opcionalmente, un aceite. Las "macromoléculas orgánicas" preferidas, es decir, agentes gelificantes, son polímeros de ácido acrílico reticulados tal como la familia de polímeros "carbómero", por ejemplo, carboxipolialquilenos que se pueden obtener comercialmente bajo el CARBOPOL. También se prefieren polímeros hidrófilos tal como óxidos de polietileno, copolímeros de polioxietileno-polioxipropileno y alcohol polivinílico; polímeros celulósicos tal como hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa y metilcelulosa; gomas tal como tragacanto y goma xantana; alginato de sodio; y gelatina. A fin de preparar un gel uniforme, se pueden agregar agentes dispersantes tal como alcohol o glicerina, o el agente gelificante se puede dispersar por trituración, mezcla mecánica o agitación, o combinaciones de los mismos.

Las lociones son preparaciones que se van a aplicar a la superficie de la piel sin fricción, y son habitualmente preparaciones líquidas o semilíquidas en las cuales las partículas, incluido el agente activo, están presentes en una base de agua o alcohol. Las lociones son usualmente suspensiones de sólidos y, preferentemente, para el presente propósito, comprenden una emulsión oleosa líquida del tipo aceite en agua. Las lociones son formulaciones preferidas para tratar áreas corporales grandes, debido a la facilidad de aplicar una composición más fluida. En general, es necesario que la materia insoluble en una loción se divida finamente. Las lociones habitualmente contendrán agentes de suspensión para producir mejores dispersiones, así como compuestos útiles para localizar y mantener el agente activo en contacto con la piel, por ejemplo, metilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio o similares.

Las pastas son formas de dosis semisólidas en las cuales el agente activo se suspende en una base adecuada. Dependiendo de la naturaleza de la base, las pastas se dividen entre pastas grasas o aquellas elaboradas de geles acuosos de una sola fase. La base en una pasta grasa es en general petrolato o petrolato hidrófilo o similares. Las pastas elaboradas a partir de geles acuosos de una sola fase en general incorporan carboximetilcelulosa o similares como base.

Las vendas se componen de una mezcla pastosa que se extiende sobre el cuerpo, ya sea directamente o después de saturarse en un material de base tal como una tela. Los medicamentos, incluidas las bases de la invención, se pueden disolver o dispersar dentro de la venda para hacer una venda medicada.

Los bioadhesivos son preparaciones que se adhieren a las superficies de los tejidos corporales. Las formulaciones bioadhesivas poliméricas se conocen bien en la técnica; ver, por ejemplo, Heller et al., "Biodegradable polymers as drug delivery systems", en Chasin, M. y Langer, R., eds.: Dekker, New York, pp. 121-161 (1990); y patente de Estados Unidos No. 6,201,065. Los bioadhesivos no poliméricos adecuados también se conocen en la técnica, incluidos ciertos ésteres de ácidos grasos (patente de Estados Unidos No. 6,228,383).

Las formulaciones descritas en esta invención también se pueden preparar con liposomas, micelas y microesferas. Los liposomas son vesículas microscópicas que tienen una pared lipídica que comprende una bicapa lipídica, y también se pueden usar como sistemas de administración de fármacos en la presente. En general, las formulaciones de liposomas se prefieren para agentes farmacéuticos pobremente solubles o insolubles. Las preparaciones de liposomas para usarse en la presente invención incluyen preparaciones catiónicas (cargadas positivamente), aniónicas (cargadas negativamente) y neutras. Los liposomas catiónicos están fácilmente disponibles. Por ejemplo, los liposomas de $N[1-2,3\text{-dioleiloxi}]\text{propil}-N,N,N\text{-trietilamonio}$ (DOTMA) están disponibles bajo el nombre comercial LIPOFECTIN®. (GIBCO BRL, Grand Island, N.Y.). De manera similar, los liposomas aniónicos y neutros también están fácilmente disponibles, por ejemplo, de Avanti Polar Lipids (Birmingham, Ala.), o se pueden preparar fácilmente usando materiales fácilmente disponibles. Estos materiales incluyen fosfatidil colina, colesterol, fosfatidil etanolamina, dioleoilfosfatidil colina (DOPC), dioleoilfosfatidil glicerol (DOPG), dioleoilfosfatidil etanolamina (DOPE), entre otros. Estos materiales también se pueden mezclar con DOTMA en relaciones apropiadas. Los métodos para elaborar liposomas usando estos materiales se conocen bien en la técnica.

Se conoce en la técnica que las micelas están compuestas por moléculas de agentes tensioactivos, dispuestas de modo que sus grupos de cabeza polares forman una cubierta esférica externa, en tanto que las cadenas de hidrocarburos hidrófobas están orientadas hacia el centro de la esfera, formando un núcleo. Las micelas se forman en una solución acuosa que contiene agente tensioactivo a una concentración suficientemente alta para que las micelas resulten naturalmente. Los agentes tensioactivos útiles para formar micelas incluyen, pero no se limitan a, laurato de potasio, octano sulfonato de sodio, decano sulfonato de sodio, dodecano sulfonato de sodio, lauril sulfato de sodio, docusato de sodio, bromuro de deciltrimetilamonio, bromuro de dodeciltrimetilamonio, bromuro de tetradeciltrimetilamonio, cloruro de tetradeciltrimetilamonio, cloruro de dodecilamonio, éter dodecílico de polioxil 8, éter dodecílico de polioxil 12, nonoxinol 10 y nonoxinol 30. Las formulaciones de micelas se pueden usar en conjunto con la presente invención ya sea por incorporación en un sistema de administración tópica o transdérmica, o en una formulación que se va a aplicar a un sitio diana (por ejemplo, vestíbulo) y tejidos circundantes.

Las microesferas, de manera similar, se pueden incorporar en las presentes formulaciones y sistemas de

administración de fármacos. Al igual que los liposomas y micelas, las microesferas encapsulan esencialmente un fármaco o una formulación que contiene un fármaco. Las microesferas en general, aunque no necesariamente, se forman a partir de polímeros biocompatibles sintéticos o que se presentan de manera natural, pero también pueden comprender lípidos cargados tal como fosfolípidos. La preparación de microesferas se conoce bien en la técnica y se describe en los textos y literatura pertinentes.

Se pueden incluir diferentes aditivos conocidos en la técnica en las formulaciones tópicas. Por ejemplo, se pueden usar solventes, incluidas cantidades relativamente pequeñas de alcohol, para solubilizar ciertos componentes de formulación. Las presentes formulaciones también pueden incluir aditivos convencionales tal como opacificadores, antioxidantes, fragancia, colorantes, agentes gelificantes, agentes espesantes, estabilizadores, agentes tensioactivos y similares. También se pueden agregar otros agentes, tal como agentes antimicrobianos, para inhibir el crecimiento de microbios tal como bacterias, levaduras y mohos. Los agentes antimicrobianos de ejemplo se seleccionan habitualmente del grupo que consiste en los ésteres metílicos y propílicos del ácido p-hidroxibenzoico (es decir, metil y propil parabeno), benzoato de sodio, ácido sórbico, imidurea y combinaciones de los mismos.

En un aspecto no abarcado por la redacción de las reivindicaciones, los compuestos de mediadores pro-resolutivos descritos anteriormente y composiciones relacionadas son útiles en métodos para tratar diferentes trastornos o condiciones inflamatorias. Las variedades o combinaciones de esta terapia incluyen, aunque no se limitan a las siguientes aplicaciones de ejemplo: un aerosol tópico/transdérmico que usa un dispensador de bomba radiante; un ungüento/bálsamo tópico/transdérmico frotado en el área tratada; un enjuague de limpieza de heridas tópico/transdérmico; un roll-on tópico/transdérmico para alivio de dolor; una miniesponja impregnada individualmente sellada de manera hermética con la composición que se puede reconstituir con agua; un polvo de herida compuesto de material micronizado, liofilizado y un parche epidérmico/tópico de liberación prolongada para administración escalonada y secuencial de la composición para la aplicación específica del sitio.

La composición terapéutica se puede administrar preferentemente como sea necesario. Por ejemplo, para condiciones severas, se puede usar aproximadamente 1-4 veces por día de manera diaria. Además, la composición terapéutica se puede administrar de manera alternativa de forma semanal, quincenal, trisemanal, semanal o mensual hasta que la condición se trate o se remedie como se desee. Además, la administración puede comenzar inicialmente de forma diaria y entonces, en respuesta a la mejora clínica, la transición a una administración semanal, mensual, etc. En lugar de usarse únicamente como una ayuda de tratamiento, la composición de la presente invención también se puede usar para mantener a un usuario en condición libre de dolor.

En ciertas realizaciones, la dosis efectiva de una composición que comprende uno o más mediadores pro-resolutivos como se describe en la presente se puede administrar a un paciente una vez. En ciertas realizaciones, la dosis efectiva de una composición que comprende un mediador pro-resolutivo se puede administrar a un paciente repetidamente. A los pacientes se les puede administrar una cantidad terapéutica de una composición que comprende un mediador pro-resolutivo a 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg, tal como 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 2,5 mg/kg, 5 mg/kg, 10 mg/kg, 15 mg/kg, 20 mg/kg, 25 mg/kg, 30 mg/kg, 40 mg/kg o 50 mg/kg. Una composición que comprende un mediador pro-resolutivo se puede administrar durante un período de tiempo, tal como durante un período de 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos o 25 minutos. La administración se repite, por ejemplo, de forma regular, tal como cada hora durante 3 horas, 6 horas, 12 horas o más o tal como quincenal (es decir, cada dos semanas) durante un mes, dos meses, tres meses, cuatro meses o más. Después de un régimen de tratamiento inicial, los tratamientos se pueden administrar con menos frecuencia. Por ejemplo, después de la administración quincenal durante tres meses, la administración se puede repetir una vez al mes, durante seis meses o un año o más. La administración de una composición que comprende un mediador pro-resolutivo puede reducir los niveles de un marcador o síntoma de, por ejemplo, inflamación por al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 % o al menos 90 % o más.

El tratamiento de la LPV y otras condiciones del tracto genital femenino implica la administración vaginal o perivaginal. Con ese fin, las formas de dosis vaginales o perivaginales pueden incluir supositorios, cremas, ungüentos, formulaciones líquidas, pesarios, tampones, geles, pastas, espumas o aspersiones vaginales. El supositorio, crema, ungüento, formulación líquida, pesario, tampón, gel, pasta, espuma o aerosol para administración vaginal o perivaginal comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del agente activo seleccionado y uno o más portadores no tóxicos convencionales adecuados para administración vaginal o perivaginal de fármacos. Las formas vaginales o perivaginales de la presente invención se pueden fabricar usando procesos convencionales como se divulga en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, supra (ver también Drug Formulations como se adapta en patente de Estados Unidos No. 6,515,198; 6,500,822; 6,417,186; 6,416,779; 6,376,500; 6,355,641; 6,258,819; 6,172,062; y 6,086,909). La unidad de dosis vaginal o perivaginal se puede fabricar para desintegrarse rápidamente o durante un período de varias horas. El período de tiempo para la desintegración completa puede estar en el intervalo de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 6 horas, por ejemplo, menos de aproximadamente 3 horas.

El mediador pro-resolutivo descrito anteriormente se puede incluir en otras composiciones o kits adecuados. Los ejemplos de estas composiciones y kits incluyen un dispositivo o agente de control de natalidad, un producto

5 sanitario femenino tal como una ducha vaginal, una compresa sanitaria o, preferentemente, un tampón, un supositorio vaginal o anal, o un enema, todos los cuales pueden proporcionar uno o más agentes terapéuticos diferentes (por ejemplo, un agente antimicrobiano, un agente antiviral y un agente anti-STD), y todos los cuales se pueden proporcionar como composiciones de liberación sostenida (por ejemplo, en un dispositivo de liberación sostenida).

En aspectos no abarcados por la redacción de las reivindicaciones, los mediadores pro-resolutivos divulgados en la presente son para usarse en un método para tratar diferentes trastornos vulvovaginales, que incluyen dolor, prurito y otras condiciones del tracto genital femenino.

10 El dolor (dolor vulvovaginal) se puede provocar por un trastorno específico: un trastorno infeccioso (tal como candidiasis recurrente y herpes); un trastorno inflamatorio (tal como liquen escleroso, liquen plano, enfermedad de Crohn anorrectal y vaginitis inflamatoria descamativa); un trastorno neoplásico (tal como enfermedad de Paget, carcinoma de células escamosas y vulvovaginitis atrófica asociada al cáncer de mama); un trastorno neurológico (tal como neuralgia postherpética, compresión o lesión nerviosa y neuroma); trauma (tal como corte genital femenino y obstetricia); un trastorno latrogénico (tal como postoperatorio, quimioterapia, injerto vulvovaginal versus hospedador y radiación); y deficiencias hormonales (tal como síndrome genitourinario de la menopausia o atrofia vulvovaginal y amenorrea lactativa).

20 La enfermedad de injerto versus hospedador (GvH) es una secuela del trasplante de células madre hematopoyéticas (HSCT) en hasta 80 % de los receptores de trasplante y en los últimos 20 años los procedimientos de HSCT han incrementado 3 veces (Gratwahl et al., Blood 100 (2002), pp. 2374-2386). GvH se desarrolla cuando las células T inmunocompetentes del injerto reconocen aloantígenos presentados por las células presentadoras de antígeno del hospedador y reaccionan contra el hospedador inmunocomprometido. Se ha estimado que la GVHD genital se presenta en hasta 48 % de las mujeres después de HSCT (Zantomio et al., Bone Marrow Transplant. 2006 Oct; 38(8):567-72), y se ha considerado un signo común de GVHD crónica por oncólogos. Se describen síntomas vaginales, incluyen sequedad, picazón, ardor, dolor, dolor introital, así como estenosis y fibrosis. Los descubrimientos físicos varían desde casos leves de eritema más leucorrea hasta descubrimientos más severos de estenosis, fibrosis y en algunos, obliteración completa de la anatomía vaginal y vulvar. Hasta la fecha, no ha habido una terapia efectiva específica para esta condición.

35 Además, el dolor se puede provocar por vulvodinia, que es un dolor vulvar de al menos tres meses de duración, sin una causa identificable clara que pueda tener factores potenciales asociados. La vulvodinia es una molestia o dolor crónico, que consiste en ardor, escozor, irritación y crudeza en la vulva. Este dolor puede ser: generalizado (ardor o irritación vulvar difusa); localizado (dolor en un área específica, tal como el vestíbulo y clítoris, vestibulodinia o clitorodinia, respectivamente); mixto (localizado y generalizado); provocado (por ejemplo, insersional, contacto); espontáneo; mixto (provocado y espontáneo); vulvodinia provocada localizada (LPV); inicio (primario o secundario); y mostrar un patrón temporal (intermitente, persistente, constante, inmediato, retrasado).

40 El mediador pro-resolutivo de la invención es para usarse en un método para reducir o prevenir la irritación del tracto genital inferior en un sujeto mujer, el método que comprende administrar una cantidad efectiva del mediador pro-resolutivo de manera tópica a un sitio de tratamiento del tracto genital inferior del sujeto, donde la irritación se asocia con una condición inflamatoria del tracto genital seleccionada del grupo que consiste en vulvodinia provocada localizada (LPV), liquen plano, liquen escleroso, vaginitis inflamatoria descamativa, vulvovaginitis atrófica asociada con cáncer de mama y prurito crónico.

50 El liquen plano se puede presentar como uno de dos tipos: (1) "clásico", que consiste en placas claramente demarcadas y de tapa plana en las membranas orales y genitales y (2) "erosivo", que consiste en una lesión erosiva y eritematosa que se origina en el vestíbulo y se extiende de manera variable por el canal vaginal. El liquen plano erosivo comúnmente se caracteriza, sintomáticamente, por dolor ardiente espontáneo crónico.

55 El liquen escleroso se caracteriza visualmente por despigmentación, pérdida de marcas mucocutáneas y hemorragia submucosa. La elasticidad reducida de la superficie de la piel puede dar por resultado fisuras en el cuerpo perineal. El liquen escleroso también puede afectar los labios menores, clítoris, surco interlabial y porción interna de los labios mayores y áreas perianales. La despigmentación circunferencial del introito vaginal y la región perianal adyacente con liquen escleroso se ha caracterizado por el término descriptivo "distribución de cerradura".

60 La vaginitis inflamatoria descamativa se caracteriza por ardor, inflamación visible y flujo vaginal incrementado en examen clínico, y evidencia de células parabasales, microscópicamente. Una característica diagnóstica clave es el descubrimiento de células parabasales con inflamación en la presencia de una estrogenización adecuada y la ausencia de etiología infecciosa en el estudio microscópico u otro método de laboratorio.

65 La vulvovaginitis atrófica asociada con cáncer de mama se caracteriza por ardor y relaciones sexuales dolorosas. En el examen clínico, hay pérdida de la arquitectura rugosa vaginal, sequedad y palidez visible en la mucosa. El uso de estrógeno tópico para el tratamiento ha sido controvertido en este grupo de sobrevivientes de cáncer.

Otras condiciones que se pueden tratar incluyen prurito crónico. El problema del prurito puede ser tan debilitante como el dolor en muchos con liquen escleroso y liquen plano. Está mediado por una fibra neural similar (fibra c) a la alodinia, aunque por microneurografía el prurito está mediado por un subconjunto neural distinto. Los mediadores (inflammosomas) del prurito parecen ser similares a los mediadores de dolor

Como se usa en la presente, los términos “tratar”, “tratamiento”, “que trata” o “mejora” cuando se usan en referencia a una enfermedad, trastorno o condición médica, se refieren a tratamientos terapéuticos para una condición, donde el objeto es revertir, aliviar, mejorar, inhibir, desacelerar o detener la progresión o severidad de un síntoma o condición (tal como dolor). El término “que trata” incluye reducir o aliviar al menos un efecto adverso o síntoma de una condición. El tratamiento es en general “efectivo” si se reducen uno o más síntomas o marcadores clínicos. De manera alternativa, el tratamiento es “efectivo” si la progresión de una condición se reduce o se detiene. Es decir, el “tratamiento” incluye no solo la mejora de los síntomas (tal como dolor) o marcadores (tal como citocinas), sino también el cese o al menos la desaceleración del progreso o empeoramiento de los síntomas que se esperaría en ausencia de tratamiento. Los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero no se limitan a, alivio de uno o más síntomas, disminución de grado del déficit, estado de inflamación estabilizado (es decir, no empeoramiento), retraso o desaceleración de inflamación y mejora o paliación de inflamación.

El término “tópico”, como se usa en la presente, se refiere a la administración de las composiciones de la invención a la piel y los tejidos subyacentes, así como a la administración a la mucosa y los tejidos subyacentes.

Los términos “disminuir”, “reducir”, “reducido”, “reducción”, “disminución” e “inhibir” se usan en la presente en general para significar una disminución por una cantidad estadísticamente significativa con respecto a una referencia. Sin embargo, para evitar dudas, “reducir”, “reducción” o “disminución” o “inhibir” habitualmente significa una disminución por al menos 10 % en comparación con un nivel de referencia y puede incluir, por ejemplo, una disminución por al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, al menos aproximadamente 99 %, hasta e incluido, por ejemplo, la ausencia completa de la entidad o parámetro dado en comparación con un nivel de referencia, o cualquier disminución entre 10-99 % en comparación con la ausencia de un tratamiento dado.

Cuando los términos “prevenir”, “que previene” y “prevención” se usan en la presente en relación con un tratamiento dado para una condición dada, significan que el paciente tratado no desarrolla un nivel clínicamente observable de la condición en absoluto o la desarrolla más lentamente y/o en un grado menor de lo que habría tenido sin el tratamiento. Estos términos no se limitan únicamente a una situación en la cual el paciente no experimenta ningún aspecto de la condición en absoluto. Por ejemplo, se dirá que un tratamiento ha “prevenido” la condición si se da durante la exposición de un paciente a un estímulo que se hubiera esperado que produjera una manifestación dada (tal como dolor) de la condición, y da por resultado que el paciente experimente menos y/o síntomas más leves de la condición de lo esperado. Por ejemplo, un tratamiento puede “prevenir” la inflamación al dar por resultado que el paciente muestre solo síntomas evidentes leves de la inflamación; no implica que no debe haber habido inflamación o ninguna producción de citocinas proinflamatorias, mediadores de inflamación y/o los eventos celulares posteriores relacionados.

Como se usa en la presente, el término “enriquecido” se refiere a una composición (por ejemplo, un aceite) que contiene los SPM y/o precursores de SPM cuando contiene un nivel más alto de los SPM y/o precursores de SPM que la fuente a partir de la cual se elaboró.

Como se usa en la presente, la frase “cantidad terapéuticamente efectiva”, “cantidad efectiva” o “dosis efectiva” se refiere a una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico o estético en el tratamiento, prevención o manejo de, por ejemplo, dolor, inflamación o cicatrización de heridas, por ejemplo, una cantidad que proporciona una disminución estadísticamente significativa en al menos un síntoma, signo o marcador de dolor, inflamación y/o cicatrización de heridas. La determinación de una cantidad terapéuticamente efectiva está dentro de la capacidad de aquellos expertos en la técnica. En general, una cantidad terapéuticamente efectiva puede variar con el historial, edad, condición, sexo del sujeto, así como la severidad y tipo de la condición médica en el sujeto, y la administración de otros agentes farmacéuticamente activos.

La frase “farmacéuticamente aceptable” se emplea en la presente para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas de dosis que son, dentro del alcance del buen juicio médico, adecuados para usarse en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin toxicidad excesiva, irritación, respuesta alérgica u otro problema o complicación, proporcional a una relación beneficio/riesgo razonable. Como se usa en la presente, el término “composición farmacéutica” se refiere al agente activo en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable comúnmente usado en la industria farmacéutica.

Como se usa en la presente, un “sujeto” significa un humano o un animal. Preferentemente, el sujeto es un

mamífero. El mamífero puede ser un humano, primate no humano, ratón, rata, perro, gato, caballo o vaca, pero no se limita a estos ejemplos. Los mamíferos diferentes de los humanos se pueden usar ventajosamente, por ejemplo, como sujetos que representan modelos animales de, por ejemplo, inflamación. Además, los métodos descritos en la presente se pueden usar para tratar animales domésticos y/o mascotas.

Un sujeto puede ser alguien que se ha diagnosticado o identificado previamente como que padece o tiene una condición en necesidad de tratamiento (por ejemplo, inflamación u otras condiciones que provocan dolor) o una o más complicaciones relacionadas con la condición y opcionalmente, pero no es necesario que ya se haya sometido a tratamiento para una condición o una o más complicaciones relacionadas con la condición. De manera alternativa, un sujeto también puede ser alguien que no se ha diagnosticado previamente como que tiene una condición en necesidad de tratamiento o una o más complicaciones relacionadas con esta condición. Por ejemplo, un sujeto puede ser alguien que exhibe uno o más factores de riesgo para una condición o una o más complicaciones relacionadas con una condición o un sujeto que no exhibe factores de riesgo. Por ejemplo, un sujeto mujer se puede tratar como se describe en la presente para remediar el dolor después de que se establece una enfermedad (por ejemplo, vulvovaginitis atrófica asociada con cáncer de mama) o antes de eventos de exposición secundaria (por ejemplo, tratar durante unas pocas semanas antes de intentar tener relaciones sexuales de nuevo).

Como se usa en la presente, "inflamación" se refiere a la respuesta biológica compleja a estímulos dañinos, tal como patógenos, células dañadas o irritantes. La inflamación es un intento de protección por parte del organismo para remover los estímulos perjudiciales, así como para iniciar el proceso de curación del tejido. Por consiguiente, el término "inflamación" incluye cualquier proceso celular que conduce a la producción de citocinas proinflamatorias, mediadores de inflamación y/o los eventos celulares posteriores relacionados que resultan de las acciones de las citocinas producidas de este modo, por ejemplo, fiebre, acumulación de líquido, hinchazón, formación de abscesos y muerte celular. Las citocinas proinflamatorias y los mediadores de inflamación incluyen, pero no se limitan a, IL-1-alfa, IL-1-beta, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-17, IL-18, TNF-alfa, factor inhibidor de leucocitos (LIF), IFN-gamma, oncostatina M (OSM), factor neurotrófico ciliar (CNTF), TGF-beta, factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y quimiocinas que quimioatracan células inflamatorias. La inflamación puede incluir tanto respuestas agudas (es decir, respuestas en las cuales los procesos inflamatorios están activos) como respuestas crónicas (es decir, respuestas marcadas por una progresión lenta y la formación de nuevo tejido conectivo). La inflamación aguda y crónica se puede distinguir por los tipos de células implicadas. La inflamación aguda frecuentemente implica neutrófilos polimorfonucleares; en tanto que la inflamación crónica normalmente se caracteriza por una respuesta linfocítica y/o granulomatosa.

Como se divulga en la presente, se proporcionan varios intervalos de valores. Se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre los límites superior e inferior de ese intervalo, también se divulga específicamente. Cada intervalo más pequeño entre cualquier valor señalado o valor intermedio en un intervalo señalado y cualquier otro valor señalado o intermedio en ese intervalo señalado se abarca dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños se pueden incluir o excluir independientemente en el intervalo, y cada intervalo donde cualquiera, ninguno o ambos límites se incluyen en los intervalos más pequeños también se abarca dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo señalado. Donde el intervalo señalado incluye uno o ambos de los límites, los intervalos que excluyen uno o ambos de aquellos límites incluidos también se incluyen en la invención.

El término "aproximadamente" o "de manera aproximada" significa dentro de un intervalo aceptable para el valor particular como se determina por un experto en la técnica, que dependerá en parte de cómo se mide o determina el valor, por ejemplo, las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar un intervalo de hasta 20 %, preferentemente hasta 10 %, más preferentemente hasta 5 % y más preferentemente aún hasta 1 % de un valor dado. De manera alternativa, en particular con respecto a sistemas o procesos biológicos, el término puede significar dentro de un orden de magnitud, preferentemente dentro de 5 veces, y más preferentemente dentro de 2 veces, de un valor. A menos que se señale de otro modo, el término "aproximadamente" significa dentro de un intervalo de error aceptable para el valor particular.

Ejemplos

Ejemplo 1

En este ejemplo, se estableció un modelo de LPV *in vitro* basado en fibroblastos. En resumen, se obtuvieron cepas de fibroblastos de dos regiones (figura 1) del tracto genital inferior de casos de vulvodinia provocada localizada (LPV) y controles sin dolor de la manera descrita en Falsetta et al. Am J Obstet Gynecol 2015, vol. 213, pp. 38 e1-12 y Foster et al., Pain 2015, vol. 156, pp. 386-96.

Más de 30 cepas de fibroblastos emparejadas obtenidas de casos afectados por LPV (que cumplen con los Criterios de Friedrich)²⁵ y se obtuvieron controles sin dolor coincidentes por edad/raza (variables críticas que influyen LPV)^{26, 27}. Todos los sujetos que contribuyeron a la biblioteca fueron premenopáusicos, se les negó el uso

de corticosteroides orales, no esteroides, inmunomoduladores o medicamentos antiinflamatorios, y reportaron una ausencia de afecciones inflamatorias sistémicas/cutáneas en el momento de la recolección de muestra. Los umbrales de dolor mecánico se determinaron (mediante un método de límites) (0,5-5 N) usando un algómetro de Wagner. La identidad de fibroblastos se confirmó por microscopía y marcadores de fibroblastos (vimentina, colágeno); solo se usan células de bajo pase (~4).

Entonces, las cepas de fibroblastos se expusieron a estímulos tal como *Candida albicans* (figura 3A). Se encontró que los fibroblastos tomados del vestíbulo doloroso de pacientes con LPV produjeron altos niveles de IL-6 cuando se infectaron con *Candida albicans*, incluso a dosis más bajas que las normalmente detectables dentro del medio vulvovaginal, en tanto que los fibroblastos de la vulva externa no dolorosa responden débilmente (figura 3A). *C. albicans* es una causa principal de infección por levaduras vulvovaginales,¹⁹⁻²² y la infección por levaduras crónicas se ha citado como un factor precedente en >70 % de pacientes con LPV.²³ La infección vulvovaginal repetida en ratones induce alodinia vulvar e hiperinervación regional, simulando descubrimientos de vulvodinia.²⁴ La LPV se asocia con disregulación inflamatoria, a pesar del hecho de que LPV no se presenta como una enfermedad inflamatoria clásica. Los signos cardinales de inflamación no son pronunciados o están vagamente presentes tanto en mujeres sanas como en mujeres afectadas por LPV, aunque la infiltración y organización de células inmunitarias es claramente diferente en LPV versus pacientes sanas.¹⁷

Además, se encontró que hubo una respuesta específica del sitio a la infección por levaduras vivas, por lo que los fibroblastos de los sitios de dolor dentro del vestíbulo vulvar son inherentemente sensibles a la levadura/productos de levadura y producen niveles elevados de mediadores pro-dolor/ proinflamatorios en comparación con los fibroblastos de sitios no dolorosos de la vulva externa (figura 4B). Además, esta respuesta parecía ser una exacerbación de una respuesta inflamatoria normal, ya que los fibroblastos del vestíbulo de mujeres sanas mostraron una respuesta similar, aunque reducida, al zymosan (producto de pared celular de levadura; figura 4B). Más importante aún, hubo una fuerte conexión entre el dolor por LPV e inflamación; el dolor en pacientes con LPV se correlacionó directamente con la producción de mediadores proinflamatorios y pro-dolor por fibroblastos cultivados a partir de biopsias de sitios dolorosos, cuando se expusieron a levadura viva (figura 4C).

Ejemplo 2

En este ejemplo, se llevaron a cabo ensayos para investigar la capacidad de los SPM para reducir la producción de mediadores proinflamatorios y pro-dolor a partir de células humanas primarias en el modelo de LPV *in vitro* descrito en el ejemplo 1.

Se probaron SPM sintetizados, purificados y comercialmente disponibles de cada clase de SPM conocida (resolvinas de serie E, resolvinas de serie D, maresinas, protectinas y lipoxinas) a concentraciones bajas/nanomolares (1-100 nM). Se ha mostrado que estas concentraciones son efectivas para resolver la inflamación en sistemas de modelos tanto *in vitro* como *in vivo* sin ninguna toxicidad. Los inventores usaron uno de dos regímenes de tratamiento que demostraron ser efectivos en fibroblastos vulvares y otras células: 1) pretratamiento durante la noche, seguido por otro tratamiento 30 min antes de la estimulación con estímulos proinflamatorios durante 48 h con una tercera dosis de SPM a las 24 h después de la exposición, o 2) postratamiento con SPM después de un pretratamiento de 30 min con estímulos inflamatorios, seguido por una dosis de refuerzo 18 h después. Ambos regímenes de tratamiento son de interés, ya que los SPM están activos durante todo el proceso inflamatorio.⁵⁻⁷ Es probable que incluso los SPM administrados después de la aparición de LPV prevengan el empeoramiento o propagación del dolor por LPV.

Los datos muestran que de 8 SPM (de 3 clases) probados, al menos 4 fueron altamente efectivos en la reducción de mediadores proinflamatorios relacionados con el dolor en fibroblastos vulvares humanos tratados con estímulos proinflamatorios relevantes usando una estrategia de pretratamiento. La lipoxina A₄, resolvina D₂, maresina 1 y epi-maresina 1 redujeron significativamente la producción de prostaglandina E₂ (PGE₂; figura 5A) e interleucina-6 (IL-6; figura 5B) por fibroblastos tanto vulvares vestibulares como externos. Sin embargo, resolvina D₁, 17(S)-HDHA, lipoxina B₄ y AT-resolvina D₁ no mostraron efectos sorprendentes en las pruebas iniciales. La maresina 1 y lipoxina A₄ también se probaron usando el régimen post-tratamiento y encontraron niveles significativamente reducidos de IL-6 y PGE₂ bajo esta estrategia (figuras 5C y 5D).

Después, se investigaron SPM de otras clases (protectinas y resolvinas de serie E), así como SPM adicionales de clases que contienen miembros que son efectivos para reducir la producción de IL-6 y PGE₂ (por ejemplo, maresinas) en un examen similar. La levadura viva de *C. albicans*, zymosan, bradiquinina e IL-1β se pueden usar como diferentes clases de activadores inflamatorios, que se ha mostrado que inducen la producción de mediadores proinflamatorios en los fibroblastos vulvares.^{3, 4, 13, 15} Los niveles de mediadores proinflamatorios se midieron usando ensayos ELISA y EIA. Los SPM que fueron efectivos para reducir más de un mediador proinflamatorio en al menos 2 pruebas se pueden examinar para pruebas adicionales usando un modelo de ratón preclínico. De manera congruente con los resultados de apoyo anteriores que muestran que varios SPM fueron efectivos en la reducción de la producción de mediadores proinflamatorios, los inventores identificaron varios SPM adicionales que son altamente efectivos como pretratamiento (figuras 23A y 23B) y postratamiento (figuras 24A y 24B). Estos SPM eficaces adicionales incluyen resolvina D₃, resolvina D₄, resolvina D₅, resolvina E₁, protectina D1 y protectina

DX. Los SPM que cumplen con los criterios para pruebas adicionales se pueden probar para su capacidad para reducir el dolor y criterios de valoración inflamatorios en un modelo de ratón de LPV como se muestra en los ejemplos más adelante.

- 5 Antes de este trabajo, no se habían identificado agentes terapéuticos efectivos para reducir los mediadores proinflamatorios/pro-dolor asociados con LPV. Por lo tanto, este trabajo representa un importante paso adelante en la identificación de posibles agentes terapéuticos que pueden no solo reducir la señalización proinflamatoria excesiva en el contexto del LPV, sino también en otras afecciones inflamatorias crónicas.

10 Ejemplo 3

En este ejemplo, se prueban varios SPM para su capacidad para reducir el dolor y criterios de valoración inflamatorios en un modelo de ratón de LPV. Solo recientemente se ha desarrollado un modelo animal inicial de LPV.²⁴ Este modelo original no se ha usado para las pruebas preclínicas de agentes terapéuticos. Las pruebas preclínicas son un paso esencial en el desarrollo de nuevas terapias efectivas aprobadas por la FDA, que son muy necesarias para LPV.^{28, 29} Por lo tanto, existe una necesidad insatisfecha urgente de un modelo animal preclínico que refleje de manera precisa LPV humana que se puede usar antes de los ensayos clínicos humanos. Congruente con esta necesidad, este modelo de ratón optimizado de LPV es ideal para la tarea de pruebas preclínicas de agentes terapéuticos, como se evidencia por datos de apoyo fuertes.

15 Aunque la estructura de SPM y la eficacia terapéutica se conservan en todas las especies,⁵⁻⁷ inventores confirmaron primero que los tejidos vulvares de ratón respondieron al tratamiento con SPM *in vitro* al cultivar explantes vulvares de ratón (biopsia por punción de 4 mm). Los explantes se estimularon con IL-1 β y entonces se llevaron a cabo ensayos para valorar la capacidad de la maresina 1 o RvD₂ para reducir la producción de PGE₂ bajo el régimen de pretratamiento establecido.

20 Se encontró que las respuestas de PGE₂ mejoradas después del tratamiento con IL-1 β se suprimieron significativamente con maresina 1 o RvD₂ en un intervalo de dosis, tan bajas como 1 nM (figura 6). Estos resultados confirmaron que la vulva de ratón respondió al tratamiento con SPM, similar a los fibroblastos humanos. También se determinó que estos ratones expresaban varios receptores de SPM (por ejemplo, ALX, GPR18). Por lo tanto, los inventores procedieron a probar las respuestas a SPM en el modelo de ratón.

25 En el modelo de ratón, zymosan (una preparación de pared celular de levadura proinflamatoria) se usó para inducir alodinia vulvar sostenida, medida por pruebas de umbral de dolor. Los inventores usaron inicialmente un sistema manual von Frey (MvF)²⁴, pero luego cambiaron a un sistema electrónico como se detalla en la presente. MvF empleó una serie de "cabellos" de diferentes espesores/rigidez que ejercen diferentes fuerzas cuando se aplican al sitio de inyección, ubicado en la línea media de la vulva posterior (entre la abertura vaginal y el ano) (figura 7A). El cabello se aplicó perpendicular a la superficie vulvar con una fuerza gradualmente creciente dentro de un intervalo de 0,100 g a 4,0 g (figura 7B). Una respuesta positiva se definió como un reflejo claro, la extensión de las 4 extremidades, salto o aseo inmediato de la vulva en respuesta al estímulo vulvar. Para determinar el umbral de MvF, se siguió el "método ascendente-descendente".³⁰ Durante la inducción de alodinia, los ratones reciben inyecciones semanales de zymosan (10 μ g/ml en 10 μ l de solución salina) durante un máximo de 6 inyecciones, hasta que se observa una reducción >33 % en el umbral de dolor durante dos semanas consecutivas de prueba (figura 7C). La prueba de umbral de dolor se realizó a la misma hora cada semana, inmediatamente antes de la inyección de zymosan; después de las primeras dos semanas de inyecciones, se realizó una determinación del cambio de umbral después de la prueba de dolor para determinar qué ratones recibirían inyecciones adicionales de zymosan. Las inyecciones de solución salina, que no contienen agente proinflamatorio, sirvieron como control negativo.

30 Usando este enfoque, los inventores confirmaron que se puede inducir alodinia vulvar, medir las respuestas al dolor mediante la determinación de umbral mecánico y valorar las respuestas al tratamiento. Sin embargo, los inventores implementaron varias modificaciones para mejorar la robustez del modelo, incluidas las siguientes: 1) usar una cepa endogámica genéticamente tratable, 2) validación del uso de un sistema electrónico de von Frey (EvF), 3) valoración del impacto del condicionamiento conductual en la respuesta al dolor, 4) recolección semanal de lavados vulvovaginales para la cuantificación de mediadores proinflamatorios, y 5) probar la capacidad de un SPM seleccionado (por ejemplo, maresina 1) para modular el dolor e inflamación en el nuevo modelo. Estas mejoras superan dos inconvenientes significativos en el modelo original: 1) Las determinaciones de umbral de MvF consumen mucho tiempo y solo se genera un valor cuantitativo por prueba, y 2) el uso de una cepa exogámica evita la manipulación genética e incrementa la variabilidad de estudio (la cepa modelo original es exogámica CD-1). Por lo tanto, los inventores eligieron probar dos cepas de ratón genéticamente tratables comúnmente usadas: C57BL/6 y BALB/c. Los inventores tuvieron el mayor éxito en los SPM clave de fondo y de prueba de C57BL/6 identificados en el ejemplo 2 en ratones C57BL/6 (por ejemplo, maresina) como posibles agentes de resolución de dolor/inflamación. Usando la misma configuración experimental que los estudios piloto (figura 7C), pero reemplazando la medición de MvF con un sistema Mousemet EvF (Topcat Metrology) e implementando las otras modificaciones mencionadas anteriormente, se encontró que las pruebas de dolor semanales generaron valores reproducibles consistentes (promedio de 5 ensayos/ratón) para cada ratón C57BL/6 (figura 8). En conjunto, los

inventores observaron una disminución progresiva de los umbrales de dolor en ratones que recibieron zymosan, que se acompañó por un incremento en la PGE₂ vaginal (figura 8). Se confirmó que la alodinia persistió durante un período de al menos 5 semanas después de la inducción de alodinia (figura 8) antes de iniciar los tratamientos diarios con 1 µg/ratón/día de maresina 1 durante un período de 4 semanas. Con el tratamiento, los inventores observaron una restauración completa a los umbrales de pre-inducción, en tanto que los niveles de PGE₂ se suprimieron y se mantuvieron a niveles por debajo de línea de base (figura 9). Estos impresionantes resultados sugieren que uno o más SPM son efectivos.

Ejemplo 4

En este ejemplo, se llevaron a cabo ensayos para investigar la capacidad de DHA, un precursor de SPM, para reducir el dolor y criterios de valoración inflamatorios usando un modelo de ratón de LPV como se describe en el ejemplo 3.

Un total de 36 ratones C57BL/6J se sometieron a 6 semanas de inducción de alodinia usando el protocolo descrito anteriormente. En resumen, zymosan se usó para inducir alodinia vulvar sostenida, medida por pruebas de umbral de dolor. Se usó un sistema electrónico von Frey (MOUSEMET™, Topcat Metrology) para aplicar una fuerza gradualmente creciente a la vulva en el sitio de inyección, ubicado en la línea media de la vulva posterior (entre la abertura vaginal y el ano) (figura 7A). El cabello se aplicó perpendicular a la superficie vulvar con una fuerza gradualmente creciente dentro de un intervalo de 0,100 g a 7,0 g (figura 7B). Una respuesta positiva se definió como (1) una extensión reflexiva y coordinada de cuatro extremidades, (2) salto o (3) aseo inmediato de la vulva en respuesta al estímulo vulvar, momento en el cual se registró la fuerza pico.

Durante la inducción de alodinia, los ratones reciben inyecciones semanales de zymosan (10 mg/ml en 10 µl de solución salina) durante un máximo de 6 inyecciones, hasta que se observa una reducción >33 % en el umbral de dolor durante 2 semanas consecutivas de prueba (figura 7C). La prueba de umbral de dolor se realizó a la misma hora cada semana, inmediatamente antes de la inyección de zymosan; después de las primeras 2 semanas de inyecciones, se realizó una determinación del cambio de umbral después de la prueba de dolor para determinar qué ratones recibirían inyecciones adicionales de zymosan.

Después de 6 semanas de inducción, un total de 35 ratones desarrollaron alodinia, que se dividieron en los siguientes grupos de tratamiento: Crema de DHA (12 ratones), crema de placebo (12 ratones) y tratamiento de simulación (11 ratones). Los ratones con crema de DHA y placebo recibieron aplicación tópica dos veces al día de la crema designada mediante un hisopo de algodón, de lunes a viernes y aplicación diaria individual los sábados y domingos durante un total de 6 semanas. Toda el área afeitada se recubrió con una capa delgada de crema antes de liberación en la jaula. Los ratones que recibieron tratamiento de simulación se trataron durante el mismo período de tiempo sobre la misma área vulvar con un hisopo de algodón humedecido con PBS estéril.

Se determinó que los ratones se habían "recuperado" de la alodinia cuando mostraron una mejora de 70 % sobre su umbral de dolor más bajo (al final de la fase de inducción de alodinia de 6 semanas) para 2 pruebas de dolor consecutivas. Después de 6 semanas de tratamiento, 9 ratones se habían recuperado en cada uno de los grupos de DHA y placebo, en tanto que 6 ratones se habían recuperado en el grupo de tratamiento de simulación (figura 13). Los mismos resultados se obtuvieron cuando la "recuperación" se definió como un umbral que era al menos 70 % del umbral de pre-dolor, antes de la inyección de zymosan. Por lo tanto, no hubo diferencias en el número de ratones que se recuperaron en el grupo de DHA versus grupo de placebo, al final del tratamiento. Sin embargo, al observar la recuperación con el paso del tiempo, los inventores observaron diferencias de tratamiento temporales entre DHA y crema de placebo (figura 13). Los ratones en el grupo de crema de DHA comenzaron a recuperarse tan pronto como en las primeras dos semanas de tratamiento, en tanto que solo un ratón se había recuperado en el grupo de crema de placebo; el grupo de crema de placebo tardó 3-4 semanas en alcanzar al grupo de crema de DHA. En general, se recuperaron menos ratones en el grupo de simulación, pero se comenzó a ver evidencia de recuperación alrededor de 4 semanas, lo que puede reflejar la resolución natural de dolor en el modelo.

En correlación con estos resultados, se encontró que el por ciento de puntuaciones de mejora fueron más altas en el grupo de DHA durante las primeras 2 semanas, en tanto que no hubo diferencias en el por ciento puntuaciones de mejora en la semana 3 (figura 14). El por ciento de puntuaciones de mejora para los ratones simulados tendieron a ser más bajas que las puntuaciones en los grupos de DHA o placebo.

Los inventores establecieron un vínculo entre los umbrales de dolor y los niveles de PGE₂ vulvovaginal en ratones C57BL/6J. Los mayores niveles de PGE₂ vaginal predicen mayor sensibilidad al dolor. Estos descubrimientos están de acuerdo con los resultados de estudios en humanos. Los niveles de PGE₂ producidos por cepas de fibroblastos vulvares humanos primarios cultivados pueden predecir el umbral de dolor en el sitio del cual se recolectaron los fibroblastos por biopsia. Los inventores realizaron lavados vulvovaginales semanales en ratones vivos a lo largo de las fases de inducción y tratamiento y encontraron que los niveles de PGE₂ eran inicialmente bajos antes de la inducción de zymosan, pero aumentaron bruscamente con la inyección de zymosan, alcanzando un pico en la semana 4 de la serie de inyección (figura 15). Estos niveles se mantuvieron antes del tratamiento, pero entonces disminuyeron rápidamente y se mantuvieron bajos en los grupos de placebo y DHA. Sin embargo, no hubo

diferencias significativas en los niveles de PGE₂ entre los grupos de DHA y placebo. También se encontró que los niveles de IL-6 fueron bajos o indetectables en la mayoría de los lavados vulvovaginales, de acuerdo con experimentos anteriores.

- 5 En general, el DHA y placebo (solo crema) mejoraron los resultados de dolor vulvar en un grado similar después del curso completo de tratamiento de 6 semanas. Sin embargo, el DHA mejoró los resultados de dolor más rápidamente que el placebo, y ambos superaron el tratamiento de simulación. La crema placebo contiene alcoholes de cadena larga y ácidos grasos que pueden tener propiedades calmantes o humectantes. Por lo tanto, la mejora en el grupo de placebo no es del todo sorprendente. La reducción de las concentraciones de estos compuestos en ensayos futuros puede ayudar a mejorar la detección de efectos específicos de DHA. Estos resultados sugieren que la crema de DHA es efectiva en la reducción del dolor vulvar humano.

Ejemplo 5

- 15 En este ejemplo, se llevaron a cabo ensayos para investigar la capacidad de una mezcla que contiene ácido docosahexaenoico (DHA) y moléculas precursoras de mediadores pro-resolutivos especializados (SPM) adicionales (14-HDHA, 17-HDHA y 18-HEPE) para reducir el dolor y criterios de valoración inflamatorios usando un modelo de ratón de LPV como se describió anteriormente.

- 20 Un total de 52 ratones C57BL/6J se sometieron a 4 semanas de inducción de alodinia usando el protocolo descrito anteriormente. En resumen, zymosan (una preparación de pared celular de levadura proinflamatoria) se usó para inducir alodinia vulvar sostenida, medida por pruebas de umbral de dolor. Se usó un sistema electrónico von Frey (Mousemet, Topcat Metrology) para aplicar una fuerza gradualmente creciente a la vulva en el sitio de inyección, ubicado en la línea media de la vulva posterior (entre la abertura vaginal y el ano) (figura 7A). El cabello se aplicó perpendicular a la superficie vulvar con una fuerza gradualmente creciente dentro de un intervalo de 0,100 g a 7,0 g (figura 7B). Una respuesta positiva se definió como (1) una extensión reflexiva clara de 4 extremidades, (2) salto o (2) aseo inmediato de la vulva en respuesta al estímulo vulvar, momento en el cual se registra la fuerza pico. Durante la inducción de alodinia, los ratones reciben inyecciones semanales de zymosan (10 mg/ml en 10 µl de solución salina) durante un total de 4 inyecciones. Se determinaron los umbrales semanales, pero solo después de la 4ª inyección se tomó una decisión sobre qué ratones continúan en la fase 2 (prueba de fármacos). Los ratones que exhibieron una reducción >33 % en el umbral de dolor (+/- 0,5 g de fuerza) durante 2 semanas consecutivas de prueba pasaron a la fase 2. La prueba de umbral de dolor se realizó a la misma hora cada semana, inmediatamente antes de la inyección de zymosan. Después de la 4ª inyección, los ratones se sometieron a una ronda final de pruebas de umbral (en la semana 5) para determinar si cumplían con los criterios para ingresar en la fase 2.

- Después de 4 semanas de inducción, un total de 48 ratones desarrollaron alodinia, que se dividieron en los siguientes grupos de tratamiento: Dosis alta de crema LIPINOVA (1,9 % de LIPINOVA en volumen; 12 ratones), dosis baja de LIPINOVA (0,7 % de LIPINOVA en volumen; 12 ratones), placebo (crema base sin LIPINOVA; 11 ratones) y tratamiento de simulación (hisopo humedecido con solución salina; 11 ratones). LIPINOVA es un producto de aceite de pescado altamente purificado que contiene ~40 % de ácido docosahexaenoico (DHA) en volumen con moléculas precursoras de mediadores pro-resolutivos especializados (SPM) adicionales (14-HDHA, 17-HDHA y 18-HEPE). Los ratones recibieron aplicación tópica dos veces al día de la crema designada de lunes a viernes y aplicación diaria individual los sábados y domingos durante un total de 4 semanas. Los ratones recibieron una aplicación de crema mediante un hisopo de algodón durante ~15 segundos. Toda el área afeitada se recubrió con una capa delgada de crema antes de liberación en la jaula. Los ratones que recibieron tratamiento de simulación se trataron durante el mismo período de tiempo con un hisopo de algodón humedecido con PBS estéril. Se determinó que los ratones se habían "recuperado" de la alodinia cuando su umbral regresó a 66 % de la línea de base de inducción pre-dolor (+/- 0,5 g de fuerza) para 2 pruebas de dolor consecutivas. Después de 4 semanas de tratamiento, 8 ratones en el grupo de dosis alta de LIPINOVA se habían recuperado (67 %), en tanto que solo 2 ratones en el grupo de dosis baja se habían recuperado (17 %) (figura 16). Ningún ratón en el grupo de tratamiento de simulación se recuperó dentro del período de 4 semanas, en tanto que un solo ratón se recuperó en el grupo de placebo (9 %). Los ratones en el grupo de dosis alta de LIPINOVA mostraron una recuperación constante con varios ratones adicionales recuperándose cada semana, en tanto que con la dosis baja, un par de ratones se recuperaron temprano (semana 2), pero no se recuperaron ratones adicionales en la semana 4. Estos datos sugieren que la recuperación se vio influenciada por la dosis de LIPINOVA, con dosis más altas que son más efectivas, en tanto que el placebo y los tratamientos de simulación fueron en gran medida inefectivos. Hubo un solo ratón que se recuperó con placebo, lo que probablemente se puede atribuir a los humectantes en la crema base.

- 60 Se usaron medidas adicionales para evaluar los efectos del tratamiento, tal como el por ciento de mejora con el tiempo (figuras 17A y 17B). El por ciento de mejora se calculó como el por ciento de incremento en los valores de umbral semanales sobre el último umbral de dolor pre-tratamiento (semana final de la fase 1). En la figura 17A, los datos se graficaron como el por ciento promedio de recuperación para todos los ratones dentro del grupo (+/- SEM). Se determinó el por ciento de recuperación para cada ratón y entonces se promediaron los valores para todo el grupo. Los ratones en el grupo de tratamiento de dosis alta de LIPINOVA mostraron puntuaciones de recuperación

porcentual consistentemente más altas cada semana versus los otros grupos. Hubo poca diferencia en la puntuación para la dosis baja de LIPINOVA en comparación con los controles (simulación y placebo), excepto durante la semana 3, donde el por ciento de puntuación de recuperación para el grupo de LIPINOVA bajo fue más cercano al grupo de LIPINOVA alto que a los controles. En la figura 17B, se graficaron los mismos datos como una gráfica de caja y bigotes, donde cada punto representa el valor de un ratón individual. Nuevamente, estos datos mostraron que las puntuaciones de recuperación porcentual fueron más altas en promedio en el grupo de LIPINOVA alto. Esta gráfica muestra que en la semana 4, la mediana del grupo de simulación, que es similar a la mediana alta de LIPINOVA, está siendo sesgada por un par de ratones con puntuaciones de mejora porcentuales particularmente altas solo esa semana. En general, estos datos demuestran que el tratamiento con la dosis más alta de LIPINOVA es más efectivo para mejorar las puntuaciones de umbral de dolor.

Los valores de umbral de dolor también se graficaron como el por ciento de la línea de base original antes de la inducción de dolor en la fase 1 (figuras 18^a y 18B). El por ciento de valores de línea de base individuales se usaron para determinar la recuperación para cada ratón (figura 16). En la figura 18A, estos valores se graficaron como el promedio para cada grupo (+/- SEM). Nuevamente, estos datos mostraron que la dosis alta de LIPINOVA superó consistentemente a los otros tratamientos, incluida la dosis baja de LIPINOVA. Para la semana 4, solo el grupo de LIPINOVA alto había cruzado el umbral de recuperación de 66 % para el grupo, lo que se puede atribuir a la observación de que la mayoría de los ratones se habían recuperado para la semana 4 (67 %). En la gráfica de caja y bigotes en la figura 18B, es evidente que la puntuación de línea de base porcentual es consistentemente más alta para los ratones en el grupo de LIPINOVA alto. En la semana 4, la mediana del grupo de simulación se acercó a la mediana del grupo de LIPINOVA alta, pero nuevamente, esto probablemente se puede atribuir a un par de ratones con puntuaciones umbrales particularmente altas esa semana.

Ejemplo 6

En este ejemplo, los ratones probados en el ejemplo 5 anterior se examinaron más para el efecto de LIPINOVA para reducir el dolor y criterios de valoración inflamatorios de la manera descrita anteriormente durante un período de 17 semanas.

Un total de 46 ratones que desarrollaron alodinia se dividieron en los siguientes grupos de tratamiento: Crema de dosis alta de LIPINOVA (1,9 %) (12 ratones), crema de dosis baja de LIPINOVA (0,7 %) (12 ratones), crema de placebo (11 ratones) y tratamiento de simulación (11 ratones). Los ratones tratados con LIPINOVA y placebo recibieron aplicación tópica dos veces al día de la crema designada mediante un hisopo de algodón, de lunes a viernes y aplicación diaria individual los sábados y domingos durante un total de 6 semanas. Toda el área afeitada se recubrió con una capa delgada de crema antes de liberación en la jaula. Los ratones que recibieron tratamiento de simulación se trataron durante el mismo período de tiempo sobre la misma área vulvar con un hisopo de algodón humedecido con PBS estéril.

Después de 6 semanas de tratamiento, se retiró el tratamiento y se monitoreó a los ratones durante otras 7 semanas para determinar si la recuperación era sostenida. Al final de esas 7 semanas, los ratones en el grupo de placebo reanudaron el tratamiento con placebo y los ratones en el grupo de simulación recibieron una terapia de combinación de 1,9 % de LIPINOVA con 1 % de pramoxina. Los ratones continuaron durante otras 3 semanas, momento en el cual se interrumpió el ensayo debido a que la mayoría de los ratones se habían recuperado naturalmente.

Se determinó que los ratones se habían “recuperado” de la alodinia cuando volvieron a al menos 70 % de su umbral de línea de base pre-dolor para 2 pruebas de dolor consecutivas. Después de 6 semanas de tratamiento, 11 ratones se habían recuperado en el grupo de dosis alta de LIPINOVA, en tanto que solo 2 ratones se habían recuperado en cada otro grupo (figura 19). Los mismos resultados se obtuvieron cuando se definió “recuperación” como al menos una mejora de 70 % sobre el umbral de dolor más bajo (último umbral de dolor antes del tratamiento).

Cuando se valoró la longevidad de los efectos del tratamiento en la fase 3 (figura 19), los inventores encontraron que los efectos del tratamiento se mantuvieron más de 7 semanas en el grupo de LIPINOVA alto, en tanto que los inventores continuaron viendo recuperación adicional en los grupos de dosis baja, simulación y placebo. Cabe destacar que el grupo de LIPINOVA bajo mostró una recuperación mejorada en comparación con los grupos de simulación y placebo, lo que sugiere que una dosis baja de LIPINOVA puede ayudar a impulsar la recuperación natural, aunque los ratones no se recuperan tan rápida y completamente como los ratones que reciben la dosis alta.

Los inventores también intentaron agregar una cuarta fase para probar una terapia adicional (combinación de dosis alta de LIPINOVA y pramoxina al 1 %). Desafortunadamente, los ratones comenzaron a recuperarse naturalmente en este momento. En última instancia, los inventores encontraron que la alodinia se puede mantener en ratones durante un período de aproximadamente 20 semanas, dando una ventana adecuada para probar tanto la aplicación terapéutica como los efectos del retiro de tratamiento.

En correlación con estos resultados, los inventores encontraron que las puntuaciones de línea de base

porcentuales fueron más altas en el grupo de dosis alta de LIPINOVA que en cualquier otro grupo durante el período de tratamiento y más allá (figura 20). Durante el tratamiento, las puntuaciones de grupo de simulación y placebo fueron similares, lo que indica que no hubo un efecto fuerte del placebo.

5 Los inventores encontraron resultados muy similares cuando evaluaron los datos usando por ciento de puntuaciones de mejora (figura 21), que es otra forma de examinar los mismos datos de umbral. Esta medida analiza la mejora con respecto a las puntuaciones más bajas en lugar de la relevancia para el punto de partida (antes de la inducción de dolor). Esta métrica es probablemente más significativa clínicamente, ya que no se puede determinar necesariamente cuál era la línea de base del paciente, en tanto que él o ella puede evaluar su dolor actual.

10 Los inventores establecieron un vínculo entre los umbrales de dolor y los niveles de PGE₂ vulvovaginal en ratones C57BL/6J. Los mayores niveles de PGE₂ vaginal predicen mayor sensibilidad al dolor. Estos descubrimientos estaban de acuerdo con los resultados de estudios en humanos. Los niveles de PGE₂ producidos por cepas de fibroblastos vulvares humanos primarios cultivados pueden predecir el umbral de dolor en el sitio del cual se recolectaron los fibroblastos por biopsia. Los inventores realizaron lavados vulvovaginales semanales en ratones vivos a lo largo de los períodos de inducción y tratamiento y encontraron que los niveles de PGE₂ eran inicialmente bajos antes de la inducción de zymosan, pero aumentaron bruscamente con la inyección de zymosan, alcanzando un pico en la semana 3 de la serie de inyección (figura 22). Estos niveles entonces disminuyeron con el tiempo con el tratamiento. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en los niveles de PGE₂ entre los grupos de tratamiento, a pesar de observar que estos niveles tendían a ser más bajos en el grupo de dosis alta de LIPINOVA.

15 En general, LIPINOVA, a la dosis más alta de 1,9 %, puede mejorar los resultados del dolor vulvar y restaurar a los ratones a los umbrales pre-dolor en menos de 6 semanas. Sin embargo, no hay una fuerte correlación entre el tratamiento y las reducciones en los niveles vulvovaginales de PGE₂. Hay una tendencia que sugiere que los niveles pueden ser más bajos con el tratamiento de dosis altas, pero no es estadísticamente significativo. No hubo mejora significativa en los grupos de control o en la dosis baja de LIPINOVA durante la fase de tratamiento; solo 2 ratones (<20 %) se recuperaron en cada uno de estos grupos. Sin embargo, el grupo de dosis baja de LIPINOVA se recuperó más rápido que los grupos de placebo y simulación durante la fase de retiro. En conjunto, estos resultados sugieren que LIPINOVA es efectiva para promover la resolución de la inflamación y reducir el dolor en un modelo de ratón de vulvodinia.

20 En resumen, la dosis alta de LIPINOVA (1,9 %) redujo drásticamente el dolor vulvar inducido por zymosan en ratones que recibieron aplicación tópica dos veces al día de lunes a viernes y una vez al día los sábados y domingos. Este tratamiento fue más efectivo que la dosis baja de LIPINOVA (0,7 %) o los controles (placebo y simulación). Casi todos los ratones que recibieron 1,9 % de LIPINOVA (11/12, 92 %) se recuperaron a las cinco semanas de tratamiento en comparación con <17 % de recuperación en cualquier otro grupo en el mismo punto de tiempo. Con el paso del tiempo, los ratones en el grupo de dosis baja de LIPINOVA (0,7 %) mostraron una recuperación mejorada en comparación con los ratones tratados con placebo o simulación, especialmente durante el período de retiro. Los efectos del tratamiento con LIPINOVA se mantuvieron durante más de 8 semanas después del retiro de tratamiento. Los niveles de PGE₂ se correlacionaron inversamente con el umbral de dolor vulvar; los niveles más altos de PGE₂ correspondieron a umbrales de dolor más bajos y predijeron mayor sensibilidad al dolor. Con el tratamiento, los niveles de PGE₂ disminuyeron con el paso del tiempo conforme los umbrales rebotaron y sensibilidad al dolor disminuyó. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de tratamiento, a pesar de valores ligeramente más bajos en el grupo de LIPINOVA al 1,9 %. Estos resultados sugieren que la crema LIPINOVA será altamente efectiva en la reducción del dolor vulvar humano.

Referencias

- 50 1. Sadownik, LA. Etiology, diagnosis, and clinical management of vulvodinia. *Int J Womens Health* 2014, vol. 6, pp. 437-49, PMID: 24833921, PMCID: PMC4014358.
- 55 2. Haefner, HK; Collins, ME; Davis, GD; Edwards, L; Foster, DC; Hartmann, ED; Kaufman, RH; Lynch, PJ; Margesson, LJ; Moyal-Barracco, M; Piper, CK; Reed, BD; Stewart, EG; Wilkinson, EJ. The vulvodinia guideline. *Journal of Lower Genital Tract Disease* 2005, vol. 9, pp. 40-51, PMID: 15870521, PMCID:
- 60 3. Falsetta, MI,; Foster, DC; Woeller, CF; Pollock, SJ; Bonham, AD; Haidaris, CG; Stodgell, CJ; Phipps, RP. Identification of novel mechanisms involved in generating localized vulvodinia pain. *Am J Obstet Gynecol* 2015, vol. 213, pp. 38 e1-12, PMID: 25683963, PMCID: PMC4485605.
- 65 4. Foster, DC; Falsetta, MI,; Woeller, CF; Pollock, SJ; Song, K; Bonham, A; Haidaris, CG; Stodgell, CJ; Messing, SP; Iadarola, M; Phipps, RP. Site-specific mesenchymal control of inflammatory pain to yeast challenge in vulvodinia-afflicted and pain-free women. *Pain* 2015, vol. 156, pp. 386-96, PMID: 25679469, PMCID: PMC4378529.
5. Buckley, CD; Gilroy, DW; Serhan, CN; Stockinger, B; Tak, PP. The resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol*

2013, vol. 13, pp. 59-66, PMID: 23197111, PMCID:

6. Serhan, CN; Chiang, N; Dalli, J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Semin Immunol* 2015, vol. 27, pp. 200-15, PMID: 25857211, PMCID: PMC4515371.
- 5 7. Serhan, CN; Chiang, N; Dalli, J; Levy, BD. Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015, vol. 7, p a016311, PMID: 25359497, PMCID:
8. Harlow, BL; Kunitz, CG; Nguyen, RH; Rydell, SA; Turner, RM; MacLehose, RF. Prevalence of symptoms consistent with a diagnosis of vulvodynia: population-based estimates from 2 geographic regions. *Am J Obstet Gynecol* 2014, vol. 210, pp. 40 e1-8, PMID: 24080300, PMCID: PMC3885163.
- 10 9. Cui, JG; Holmin, S; Mathiesen, T; Meyerson, BA; Linderth, B. Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. *Pain* 2000, vol. 88, pp. 239-48, PMID: 11068111, PMCID:
- 15 10. Lin, CR; Amaya, F; Barrett, L; Wang, H; Takada, J; Samad, TA; Woolf, CJ. Prostaglandin E2 receptor EP4 contributes to inflammatory pain hypersensitivity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2006, vol. 319, pp. 1096-103, PMID: 16966471, PMCID:
- 20 11. Akopians, AL; Rapkin, AJ. Vulvodynia: The Role of Inflammation in the Etiology of Localized Provoked Pain of the Vulvar Vestibule (Vestibulodynia). *Semin Reprod Med* 2015, vol. 33, pp. 239-45, PMID: 26132928, PMCID:
12. Baker, DA; Peresleni, T; Kocis, C. Inflammatory Markers in Vestibulodynia [4]. *Obstet Gynecol* 2016, vol. 127 Suppl 1, pp. 1S-2S, PMID: 27176158, PMCID:
- 25 13. Falsetta, MI; Foster, DC; Woeller, CF; Pollock, SJ; Bonham, AD; Haidaris, CG; Phipps, RP. A role for bradykinin signaling in chronic vulvar pain. *J Pain* 2016, PMID: 27544818, PMCID:
14. Leclair, N; Thorner, G; Sorge, I; Ritter, L; Schuster, V; Hirsch, FW. Whole-Body Diffusion-Weighted Imaging in Chronic Recurrent Multifocal Osteomyelitis in Children. *PLoS One* 2016, vol. 11, p e0147523, PMID: 26799970, PMCID: PMC4723072.
- 30 15. Foster, DC; Piekarz, KH; Murant, TI; LaPoint, R; Haidaris, CG; Phipps, RP. Enhanced synthesis of proinflammatory cytokines by vulvar vestibular fibroblasts: implications for vulvar vestibulitis. *Am J Obstet Gynecol* 2007, vol. 196, pp. 346 e1-8, PMID: 17403416, PMCID:
- 35 16. Morgan, TK; Allen-Brady, KL; Monson, MA; Leclair, CM; Sharp, HT; Cannon-Albright, LA. Familiarity analysis of provoked vestibulodynia treated by vestibulectomy supports genetic predisposition. *Am J Obstet Gynecol* 2016, vol. 214, pp. 609 e1-7, PMID: 26627726, PMCID:
- 40 17. Tommola, P; Butzow, R; Unkila-Kallio, L; Paavonen, J; Meri, S. Activation of vestibule-associated lymphoid tissue in localized provoked vulvodynia. *Am J Obstet Gynecol* 2015, vol. 212, pp. 476 e1-8, PMID: 25448516, PMCID:
- 45 18. Tommola, P; Unkila-Kallio, L; Paetau, A; Meri, S; Kalso, E; Paavonen, J. Immune activation enhances epithelial nerve growth in provoked vestibulodynia. *Am J Obstet Gynecol* 2016, PMID: 27457118, PMCID:
19. Cassone, A. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG* 2015, vol. 122, pp. 785-94, PMID: 25052208, PMCID:
- 50 20. Davies, S; Johnson, E; White, D. How to treat persistent vaginal yeast infection due to species other than *Candida albicans*. *Sex Transm Infect* 2013, vol. 89, pp. 165-6, PMID: 23180861, PMCID:
21. Giraldo, P; von Nowaskonski, A; Gomes, FA; Linhares, I; Neves, NA; Witkin, SS. Vaginal colonization by *Candida* in asymptomatic women with and without a history of recurrent vulvovaginal candidiasis. *Obstet Gynecol* 2000, vol. 95, pp. 413-6, PMID: 10711554, PMCID:
- 55 22. Harriott, MM; Lilly, EA; Rodriguez, TE; Fidel, PL, Jr.; Noverr, MC. *Candida albicans* forms biofilms on the vaginal mucosa. *Microbiology* 2010, vol. 156, pp. 3635-44, PMID: 20705667, PMCID: 3068702.
- 60 23. Donders, G; Bellen, G. Characteristics of the pain observed in the focal vulvodynia syndrome (VVS). *MedHypotheses* 2012, vol. 78, pp. 11-4, PMID: 22041052, PMCID:
24. Farmer, MA; Taylor, AM; Bailey, AL; Tuttle, AH; MacIntyre, LC; Milagrosa, ZE; Crissman, HP; Bennett, GJ; Ribeiro-da-Silva, A; Binik, YM; Mogil, JS. Repeated vulvovaginal fungal infections cause persistent pain in a mouse model of vulvodynia. *Sci Transl Med* 2011, vol. 3, p 101ra91, PMID: 21937756, PMCID: PMC3243907.
- 65

25. Bergeron, S; Binik, YM; Khalife, S; Pagidas, K; Glazer, HI. Vulvar vestibulitis syndrome: reliability of diagnosis and evaluation of current diagnostic criteria. *Obstet Gynecol* 2001, vol. 98, pp. 45-51, PMID: 11430955, PMCID:
- 5 26. Edwards, RR; Doleys, DM; Fillingim, RB; Lowery, D. Ethnic differences in pain tolerance: clinical implications in a chronic pain population. *Psychosom Med* 2001, vol. 63, pp. 316-23, PMID: 11292281, PMCID:
- 10 27. Wolf, J; Weinberger, B; Arnold, CR; Maier, AB; Westendorp, RG; Grubeck-Loebenstien, B. The effect of chronological age on the inflammatory response of human fibroblasts. *Exp Gerontol* 2012, vol. 47, pp. 749-53, PMID: 22790019, PMCID: PMC3427851.
- 15 28. Brown, CS; Foster, DC; Wan, JY; Rawlinson, LA; Bachmann, GA; Gabapentin Study, G. Rationale and design of a multicenter randomized clinical trial of extended release gabapentin in provoked vestibulodynia and biological correlates of response. *Contemp Clin Trials* 2013, vol. 36, pp. 154-65, PMID: 23816491, PMCID: PMC3779071.
- 20 29. Foster, DC; Kotok, MB; Huang, LS; Watts, A; Oakes, D; Howard, FM; Poleshuck, EL; Stodgell, CJ; Dworkin, RH. Oral desipramine and topical lidocaine for vulvodynia: a randomized controlled trial. *Obstetrics and Gynecology* 2010, vol. 116, pp. 583-93, PMID: 20733439, PMCID:
- 25 30. Chaplan, SR; Bach, FW; Pogrel, JW; Chung, JM; Yaksh, TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994, vol. 53, pp. 55-63, PMID: 7990513, PMCID:
- 30 31. Baglole, CJ; Maggirwar, SB; Gasiewicz, TA; Thatcher, TH; Phipps, RP; Sime, PJ. The aryl hydrocarbon receptor attenuates tobacco smoke-induced cyclooxygenase-2 and prostaglandin production in lung fibroblasts through regulation of the NF-kappaB family member RelB. *J Biol Chem* 2008, vol. 283, pp. 28944-57, PMID: 18697742, PMCID: 2_5708_56
- 35 32. Colucci, M; Maione, F; Bonito, MC; Piscopo, A; Di Giannuario, A; Pieretti, S. New insights of dimethyl sulphoxide effects (DMSO) on experimental in vivo models of nociception and inflammation. *Pharmacol Res* 2008, vol. 57, pp. 419-25, PMID: 18508278, PMCID:
33. Galer, BS. A comparative subjective assessment study of PENNSAID(R) and Voltaren Gel(R), two topical formulations of diclofenac sodium. *Pain Pract* 2011, vol. 11, pp. 252-60, PMID: 20854305, PMCID:
34. Xie, Y; Shi, L; Xiong, X; Wu, E; Veasley, C; Dade, C. Economic burden and quality of life of vulvodynia in the United States. *Curr Med Res Opin* 2012, vol. 28, pp. 601-8, PMID: 22356119, PMCID: Los ejemplos y descripción anteriores de las realizaciones preferidas se deben tomar como ilustrativos, en lugar de como limitantes de la presente invención como se define por las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un mediador pro-resolutivo para usarse en un método para reducir o prevenir la irritación del tracto genital inferior en un sujeto mujer, el método que comprende administrar una cantidad efectiva del mediador pro-resolutivo de manera tópica a un sitio de tratamiento del tracto genital inferior del sujeto,
- 10 donde la irritación se asocia con una condición inflamatoria del tracto genital seleccionada del grupo que consiste en vulvodinia provocada localizada (LPV), liquen plano, liquen escleroso, vaginitis inflamatoria descamativa, vulvovaginitis atrófica asociada con cáncer de mama y prurito crónico, y
- 15 donde el mediador pro-resolutivo se selecciona del grupo que consiste en resolvina D₂, resolvina D₃, resolvina D₄, resolvina D₅, resolvina E₁, maresina-1, epi-maresina-1, lipoxina A₄, protectina D1, protectina DX y DHA; o (2) una mezcla que comprende DHA, 14-HDHA, 17-HDHA y 18-HEPE.
- 20 2. El mediador pro-resolutivo para usarse de la reivindicación 1, donde el mediador pro-resolutivo es maresina-1.
3. El mediador pro-resolutivo para usarse de la reivindicación 1, donde el mediador pro-resolutivo es protectina D1.
4. El mediador pro-resolutivo para usarse de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la condición inflamatoria del tracto genital es LPV.
- 25 5. El mediador pro-resolutivo para usarse de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el mediador pro-resolutivo se administra a 0,0001 mg/kg - 100 mg/kg.
6. El mediador pro-resolutivo para usarse de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el mediador pro-resolutivo se administra una vez a la semana, 2-3 veces a la semana, una vez al día, dos veces al día o tres veces al día.
- 30 7. El mediador pro-resolutivo para usarse de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el mediador pro-resolutivo se administra antes de que el sujeto se exponga a una estimulación secundaria que provoca irritación.
8. El mediador pro-resolutivo para usarse de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el sitio de tratamiento comprende el vestíbulo vulvar.
- 35 9. El mediador pro-resolutivo para usarse de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde el sitio de tratamiento comprende la vulva externa, vestíbulo o vagina.
10. El mediador pro-resolutivo para usarse de la reivindicación 9, donde el sitio de tratamiento comprende la vulva externa.
- 40 11. El mediador pro-resolutivo para usarse de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además administrar un segundo agente terapéutico al sujeto.
- 45 12. El mediador pro-resolutivo para usarse de la reivindicación 11, donde el segundo agente terapéutico es un segundo mediador pro-resolutivo.
13. El mediador pro-resolutivo para usarse de la reivindicación 11, donde el segundo agente terapéutico es un agente antimicrobiano o un agente antiviral.

DIBUJOS

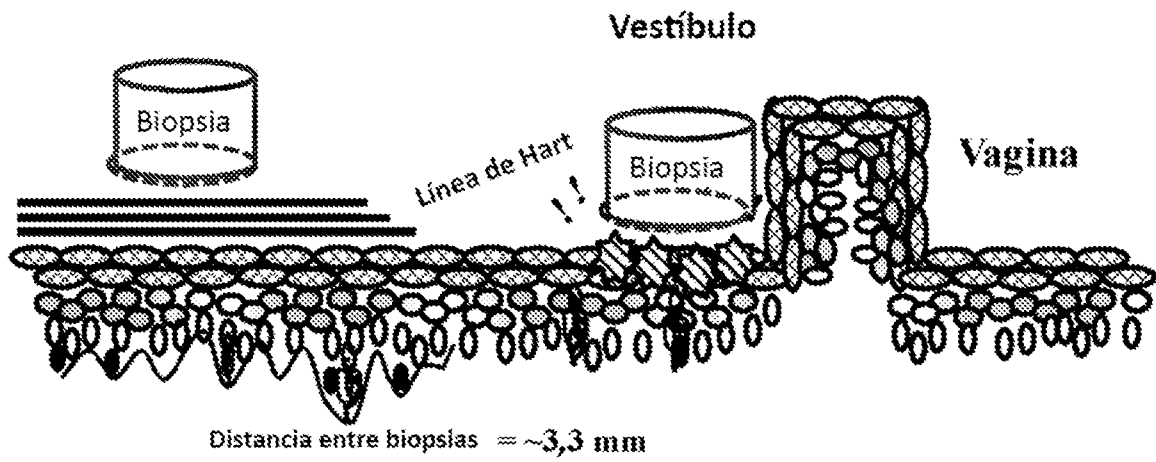


Figura 1

Biosíntesis de SPM

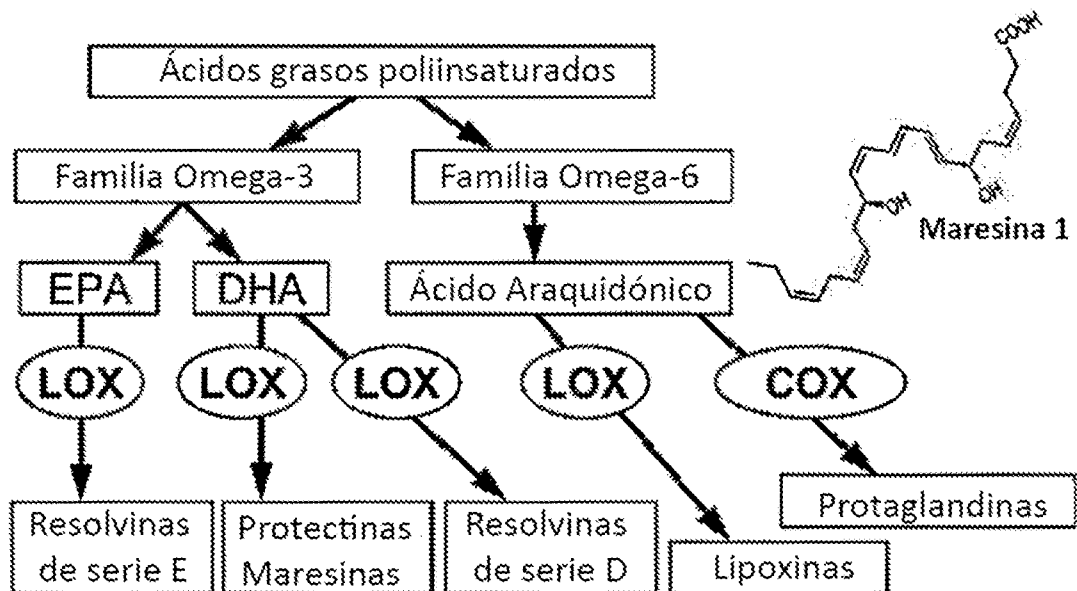


Figura 2

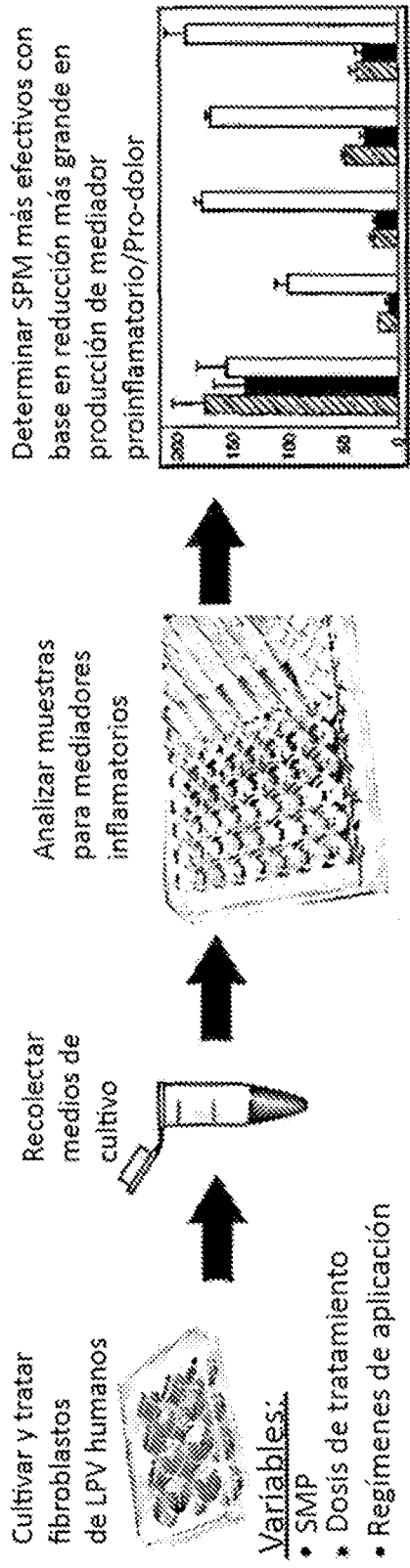


Figura 3A

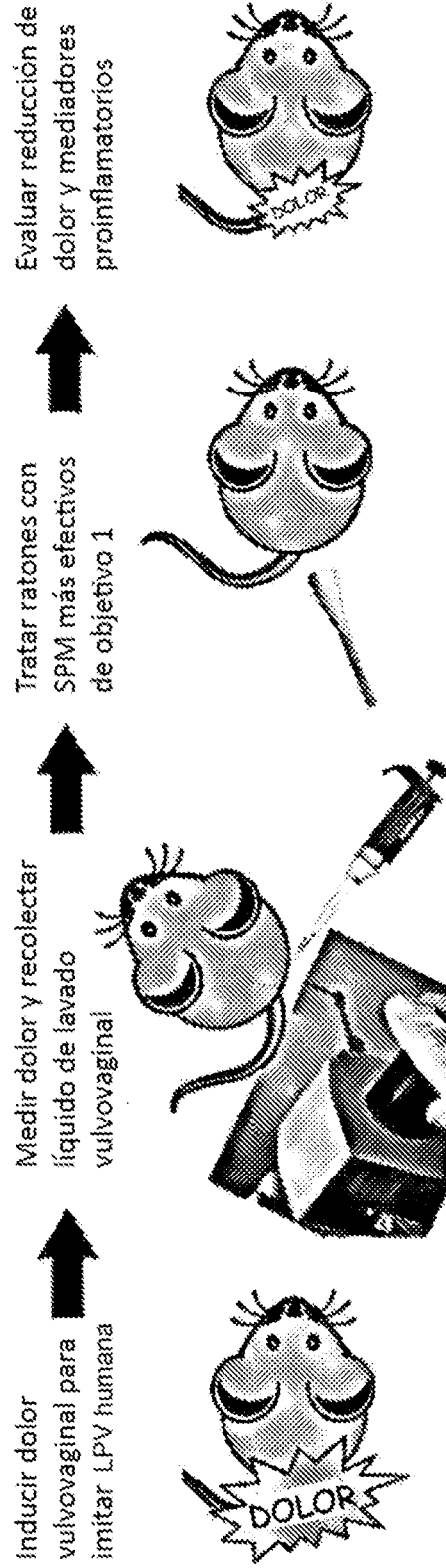
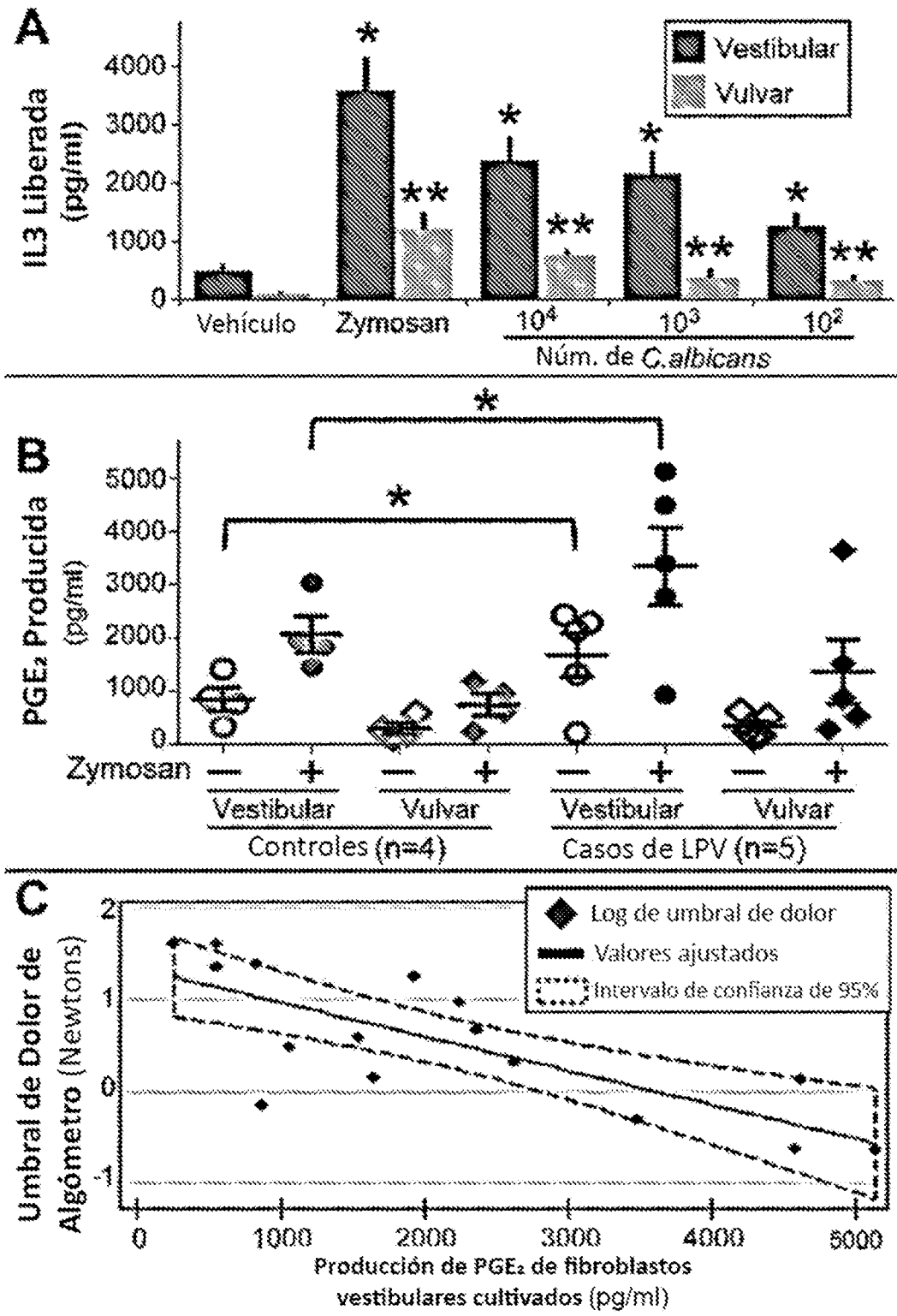
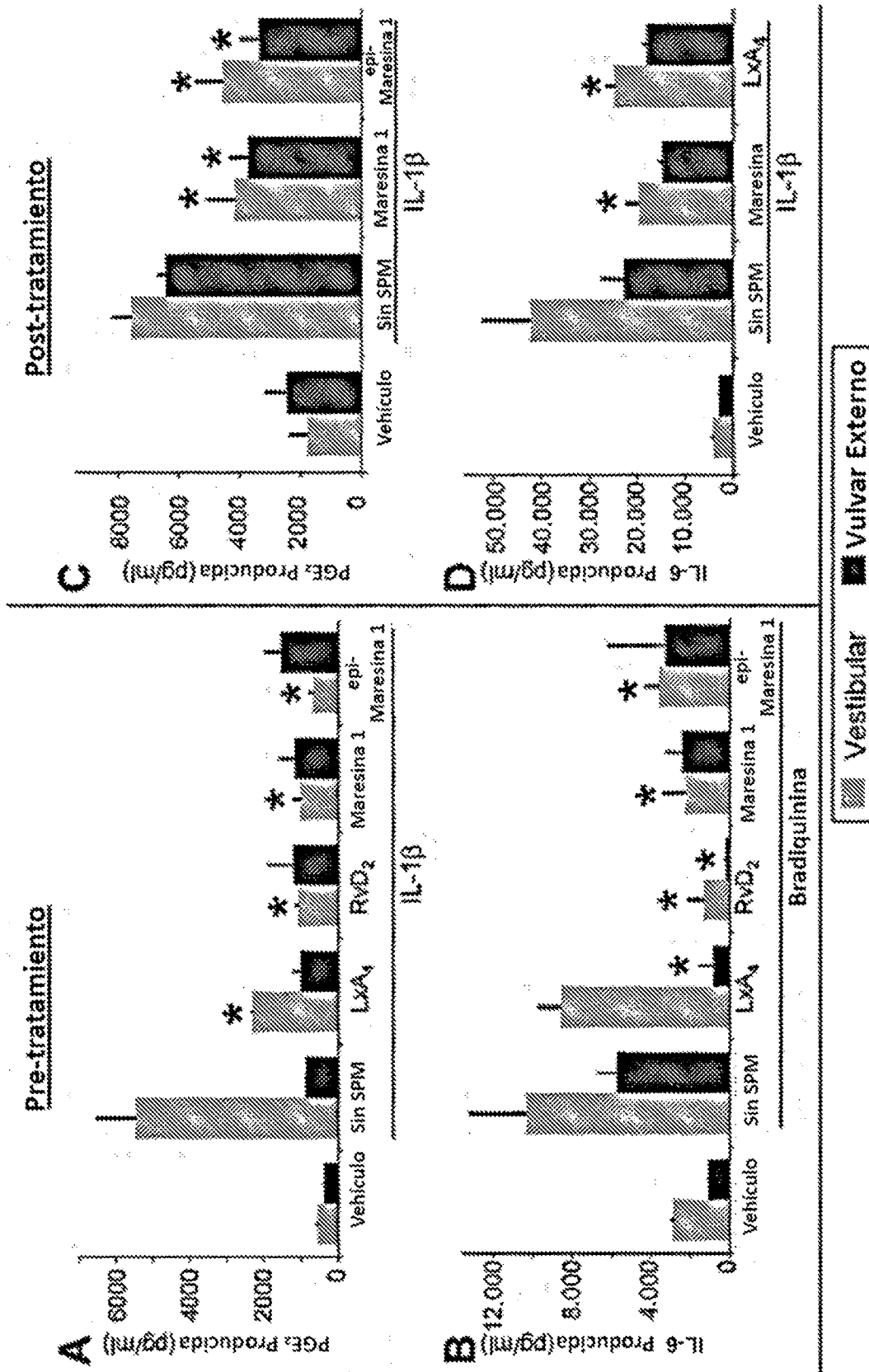


Figura 3B



Figuras 4A, 4B y 4C



Figuras 5A, 5B, 5C y 5D

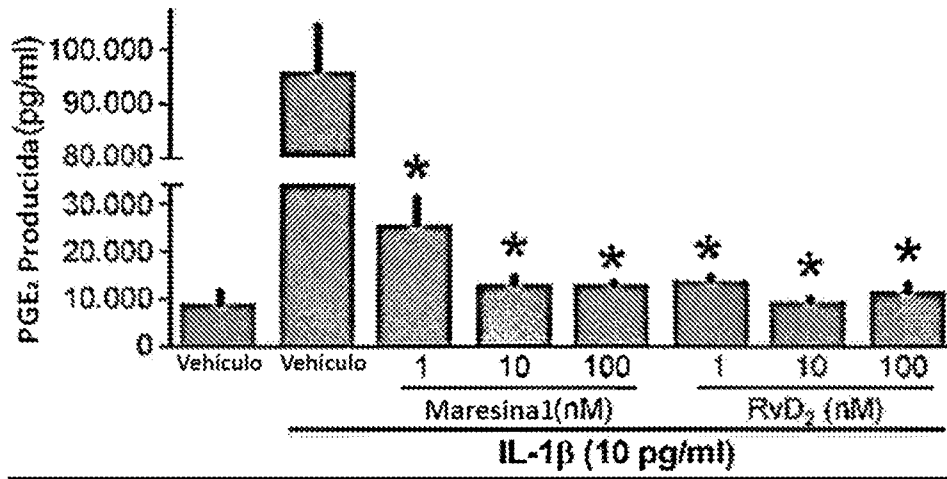
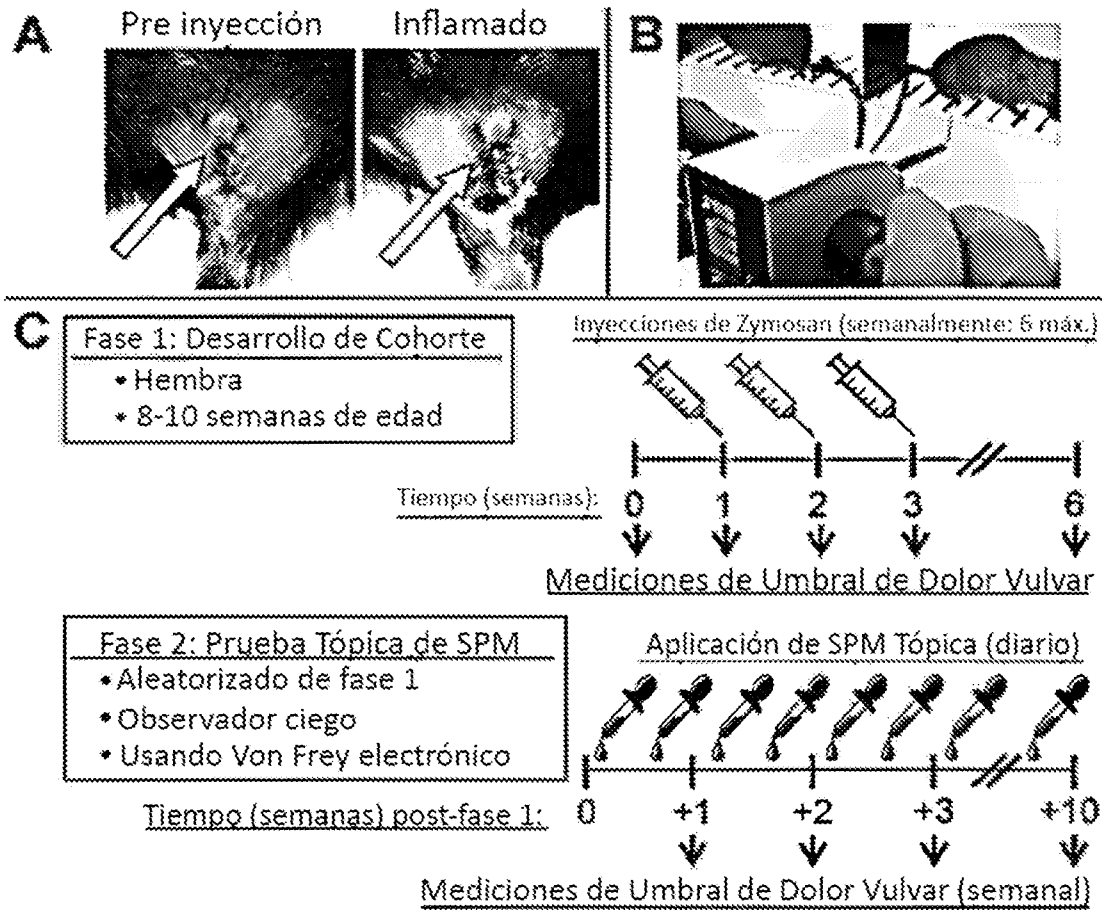


Figura 6



Figuras 7A, 7B y 7C

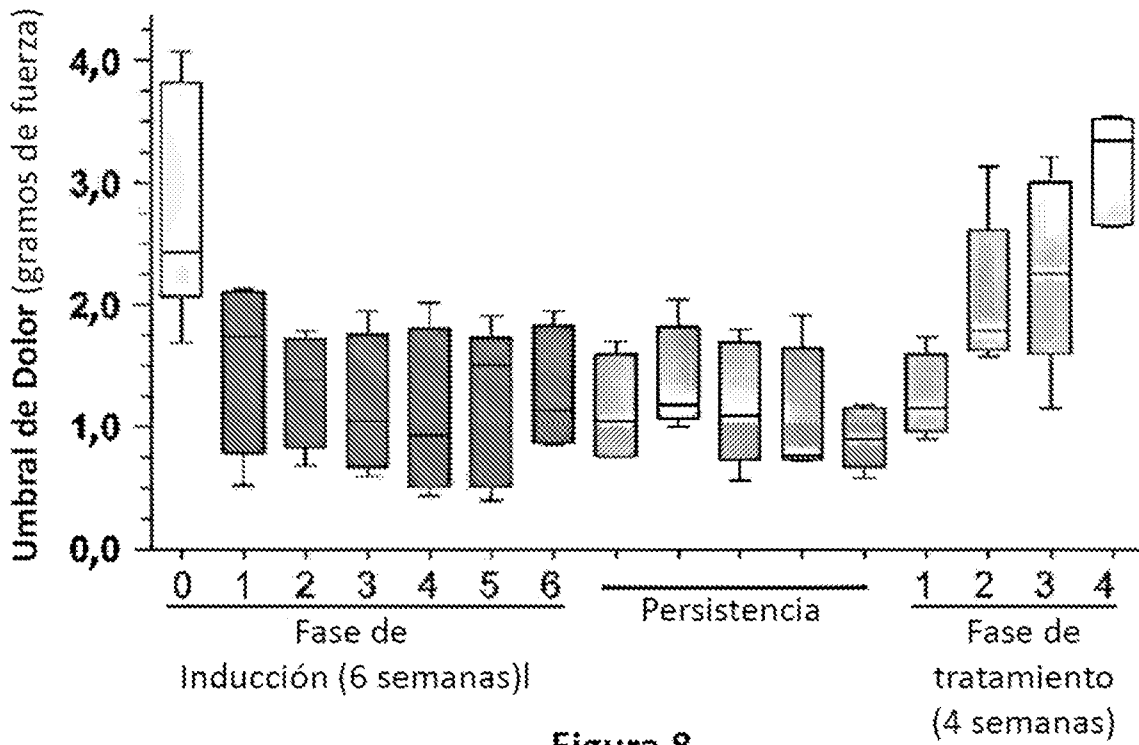


Figura 8

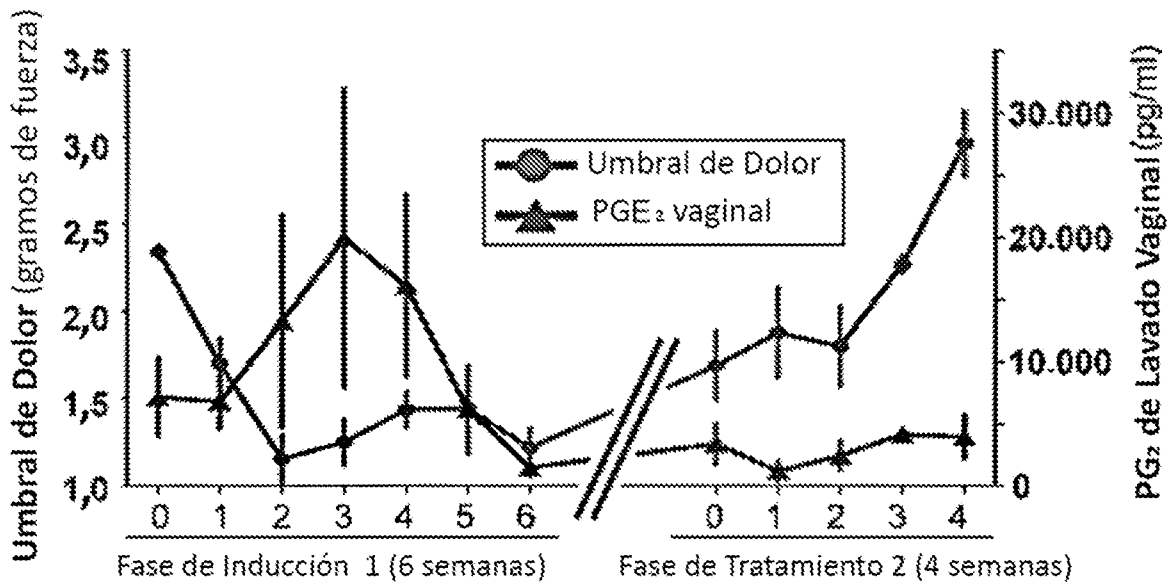


Figura 9

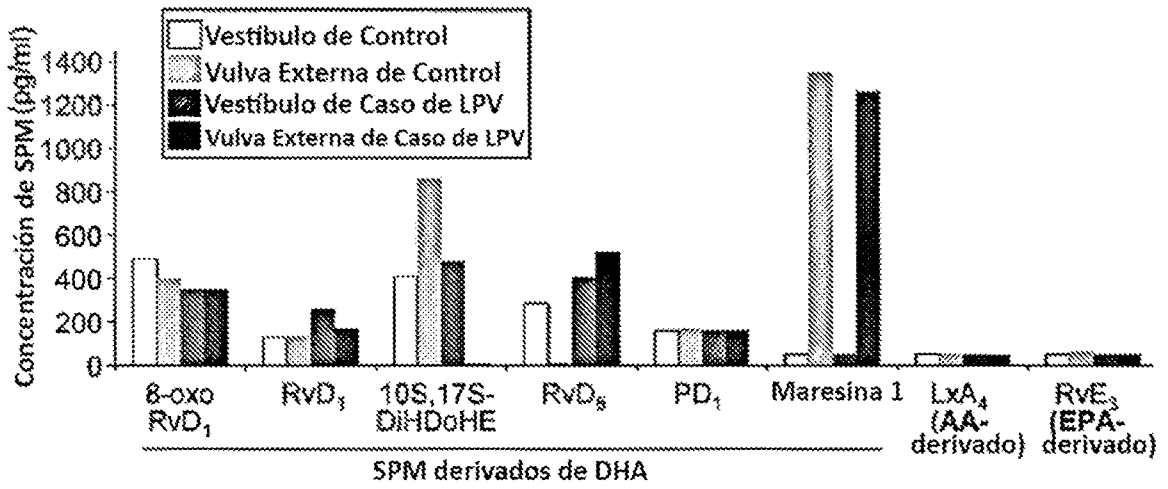


Figura 10

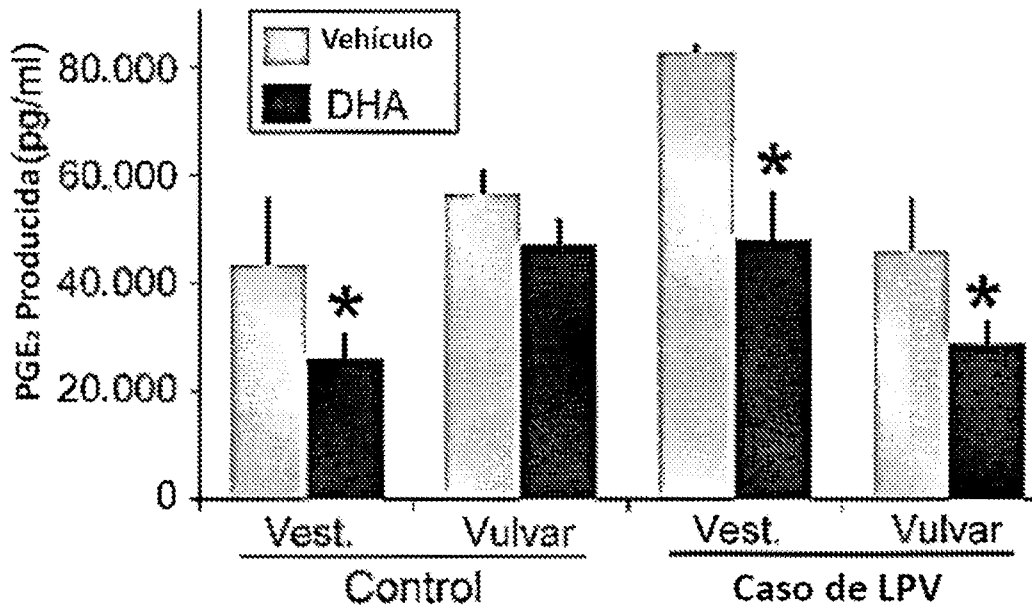
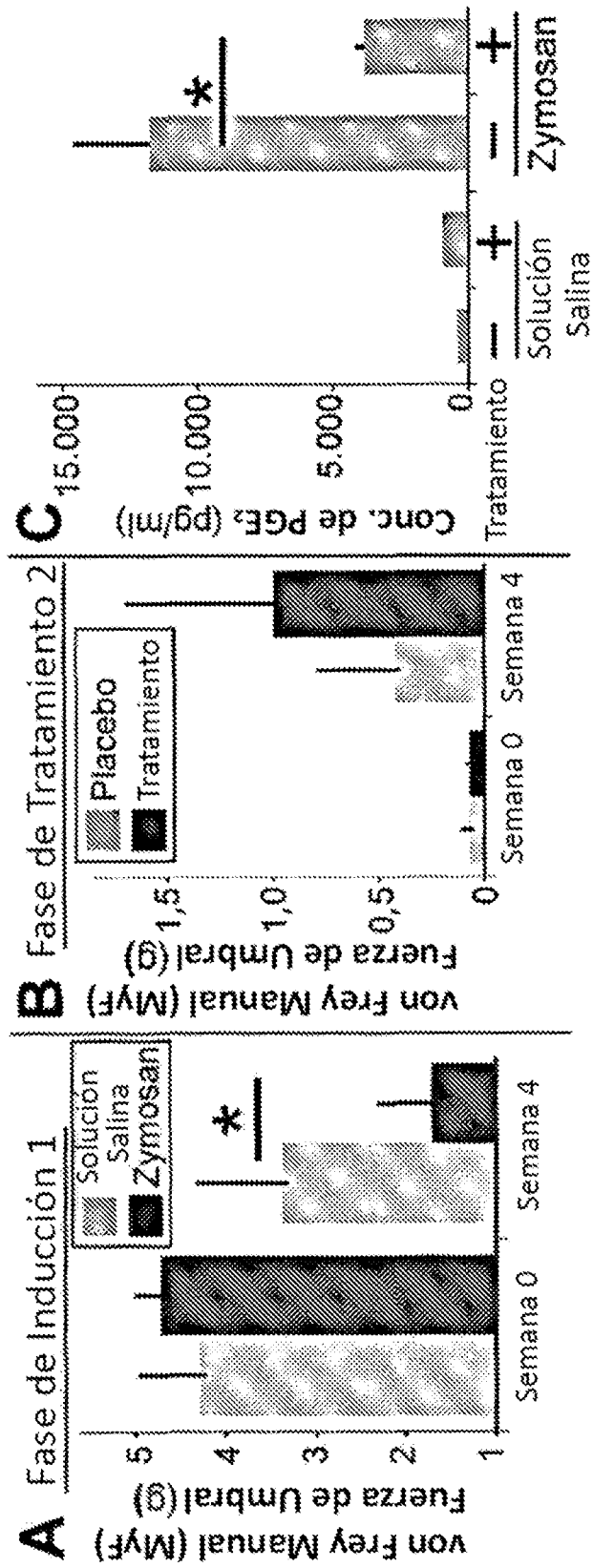


Figura 11



Figuras 12A, 12B y 12C

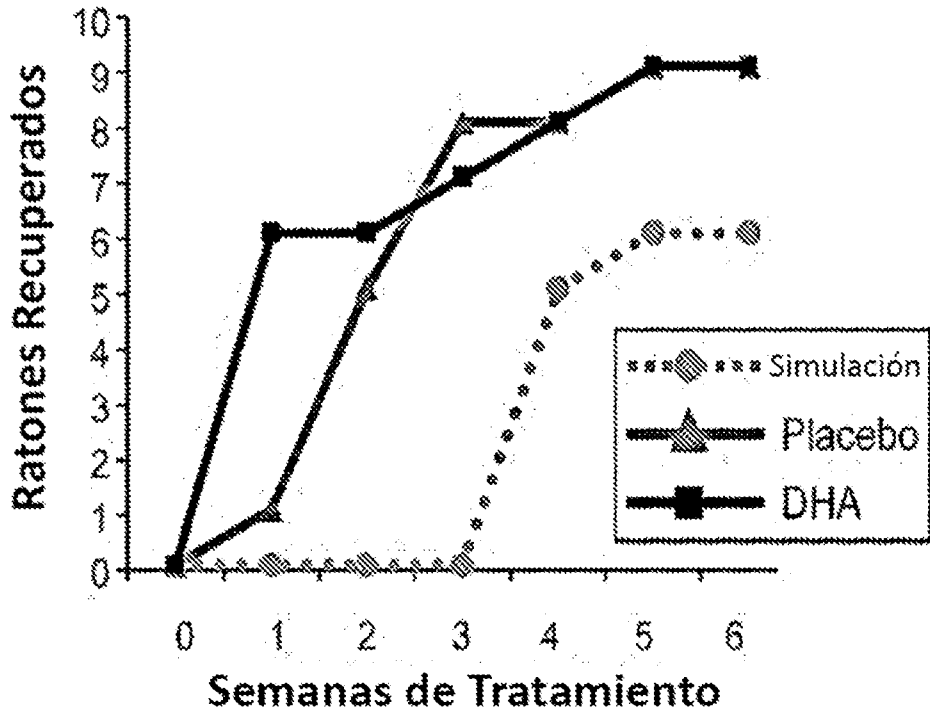


Figura 13

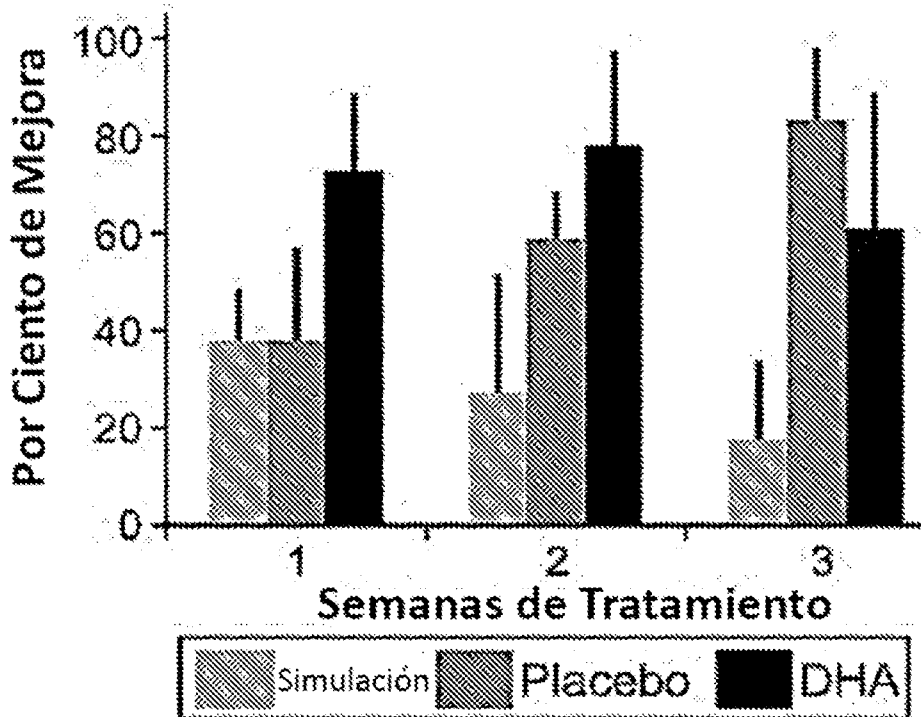


Figura 14

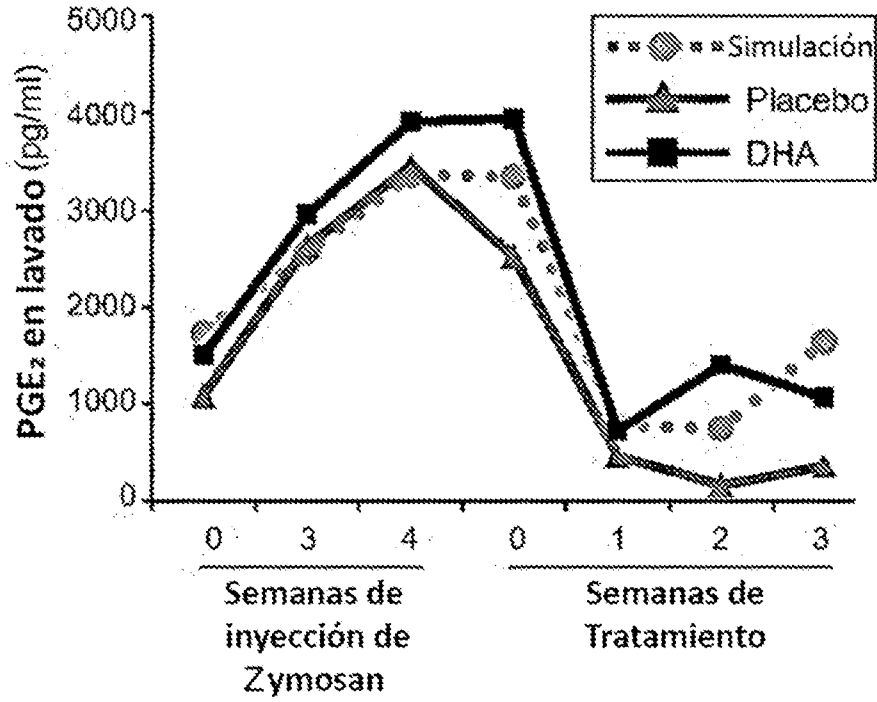


Figura 15

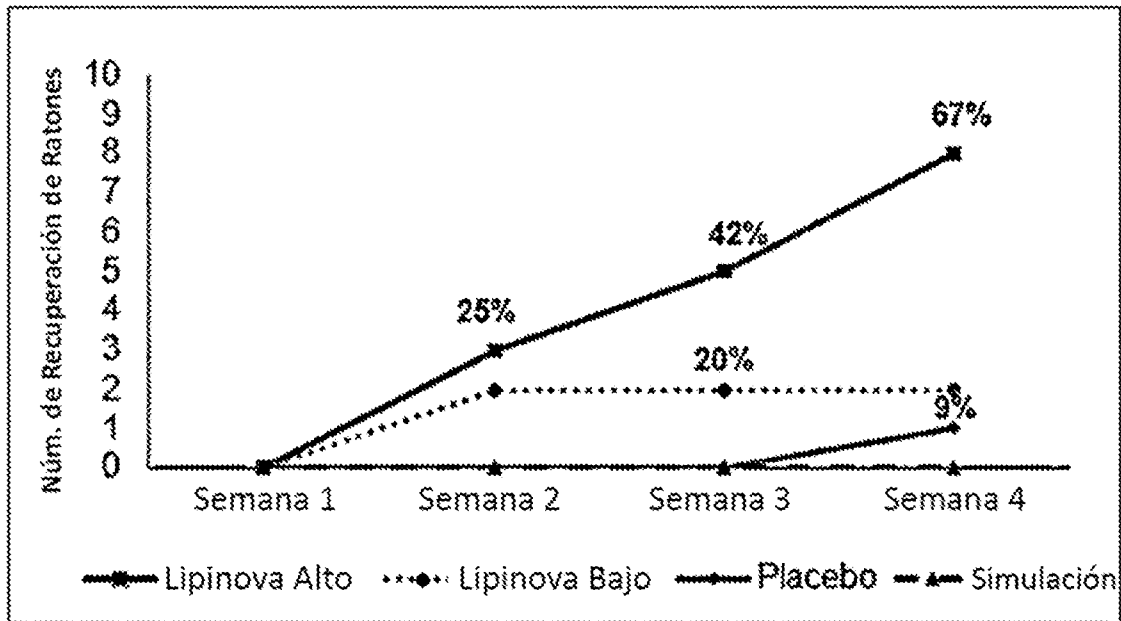
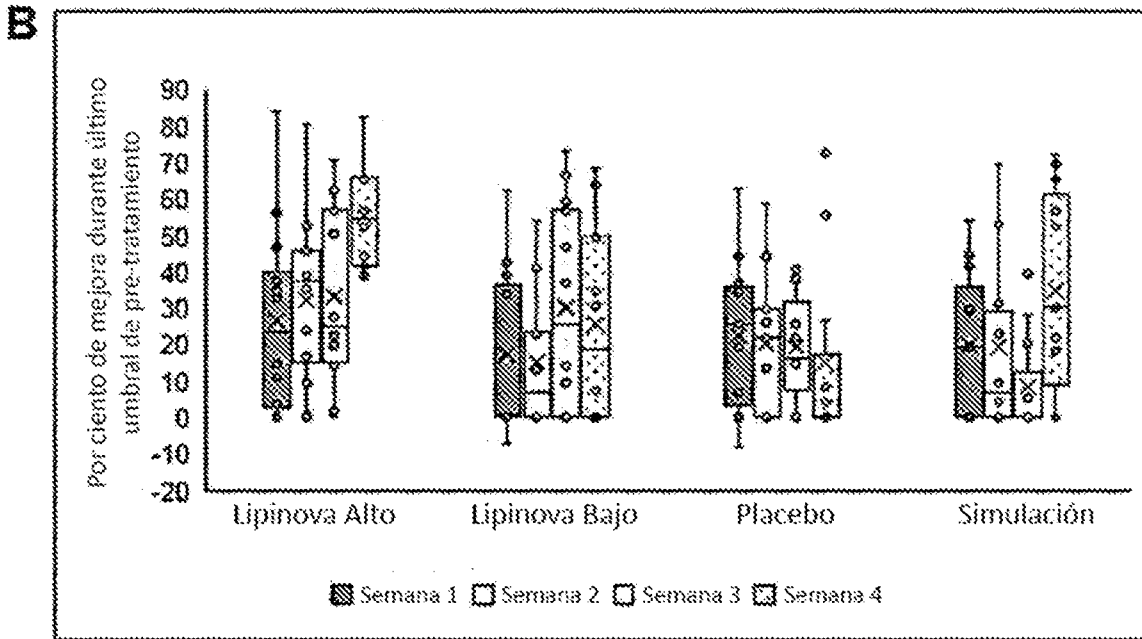
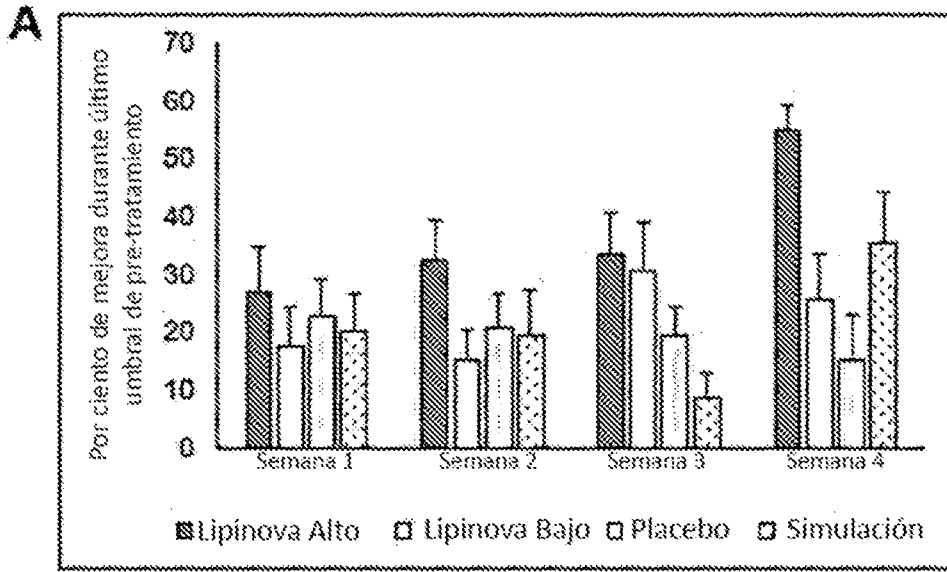
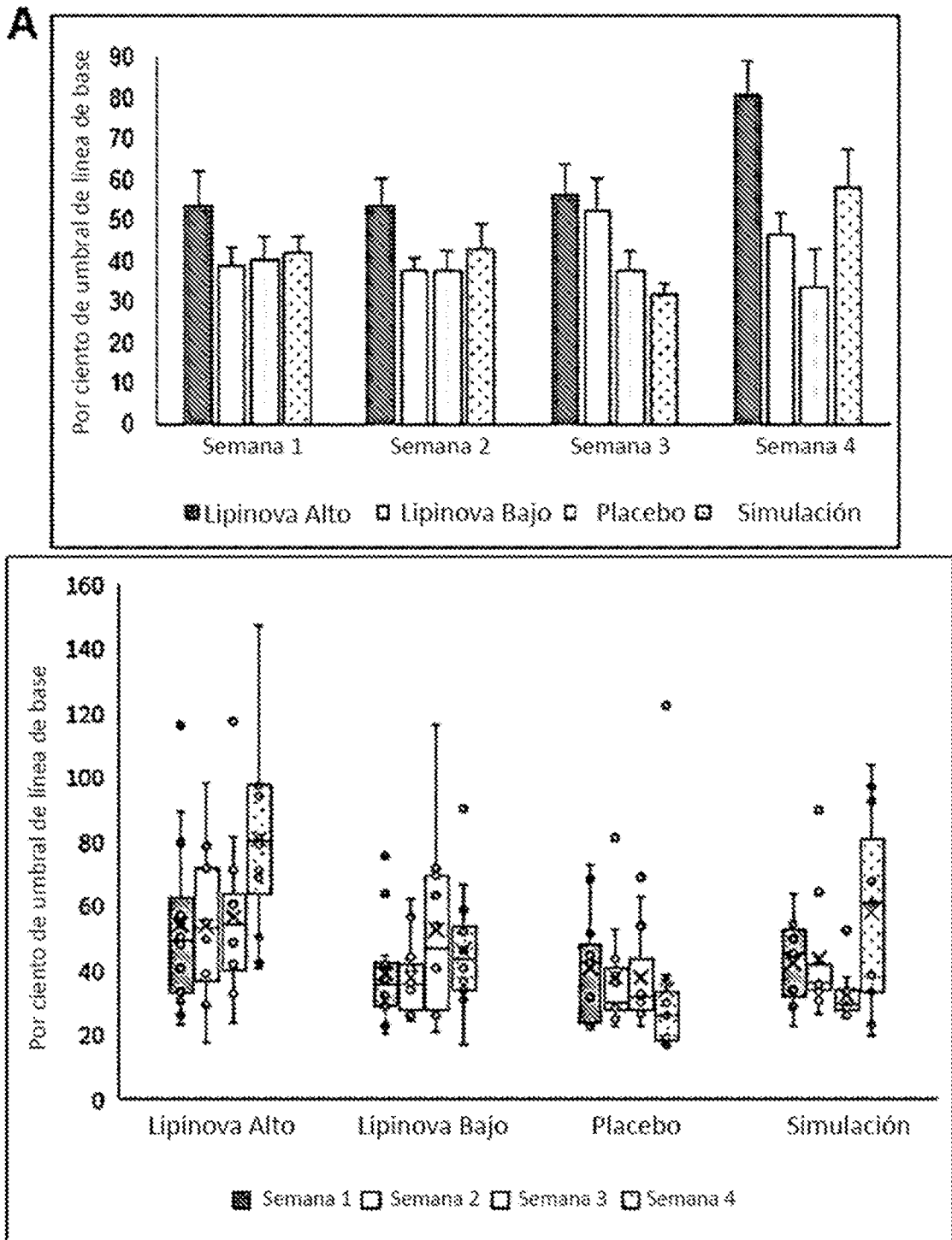


Figura 16



Figuras 17A y 17B



Figuras 18A y 18B

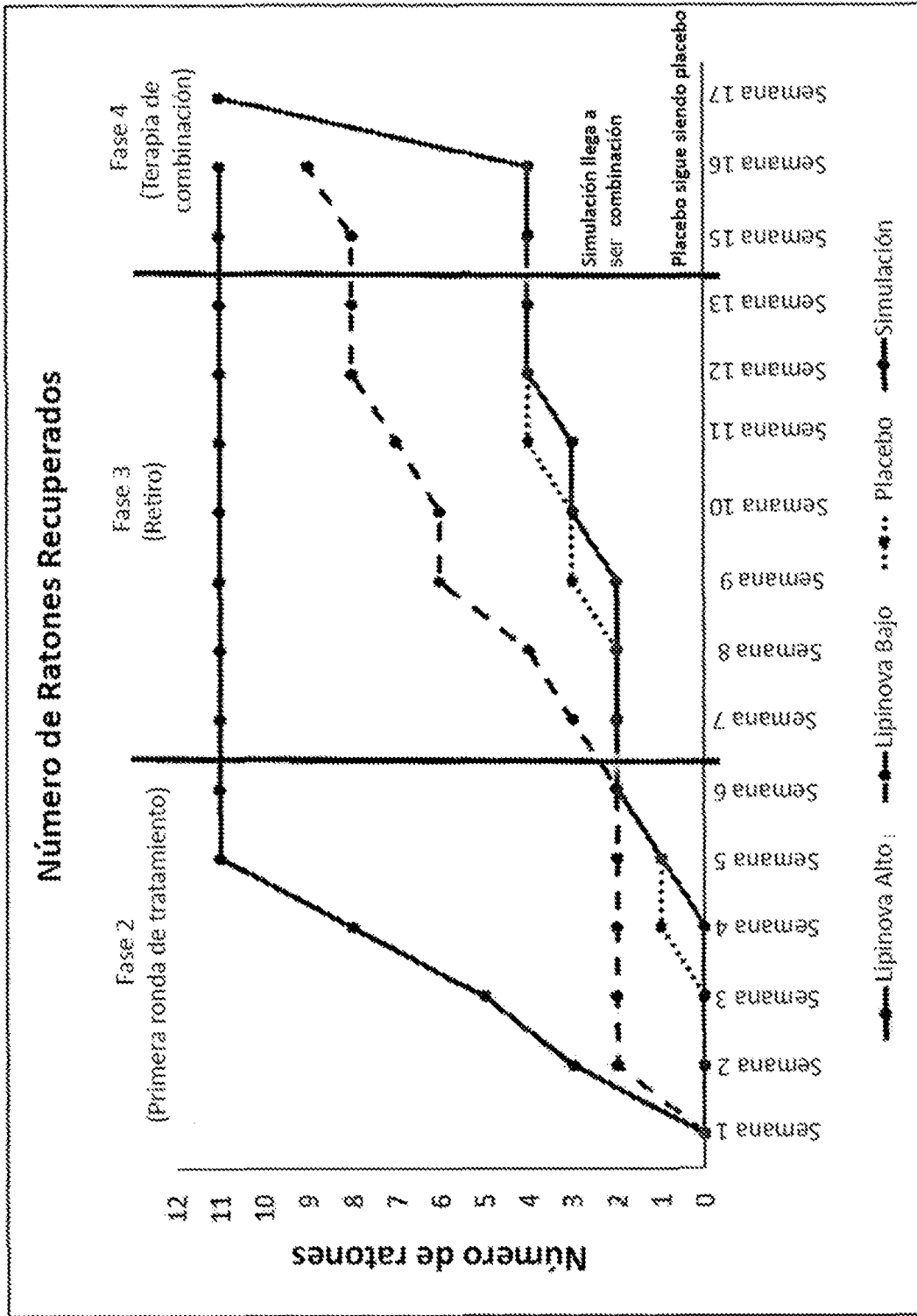


Figura 19

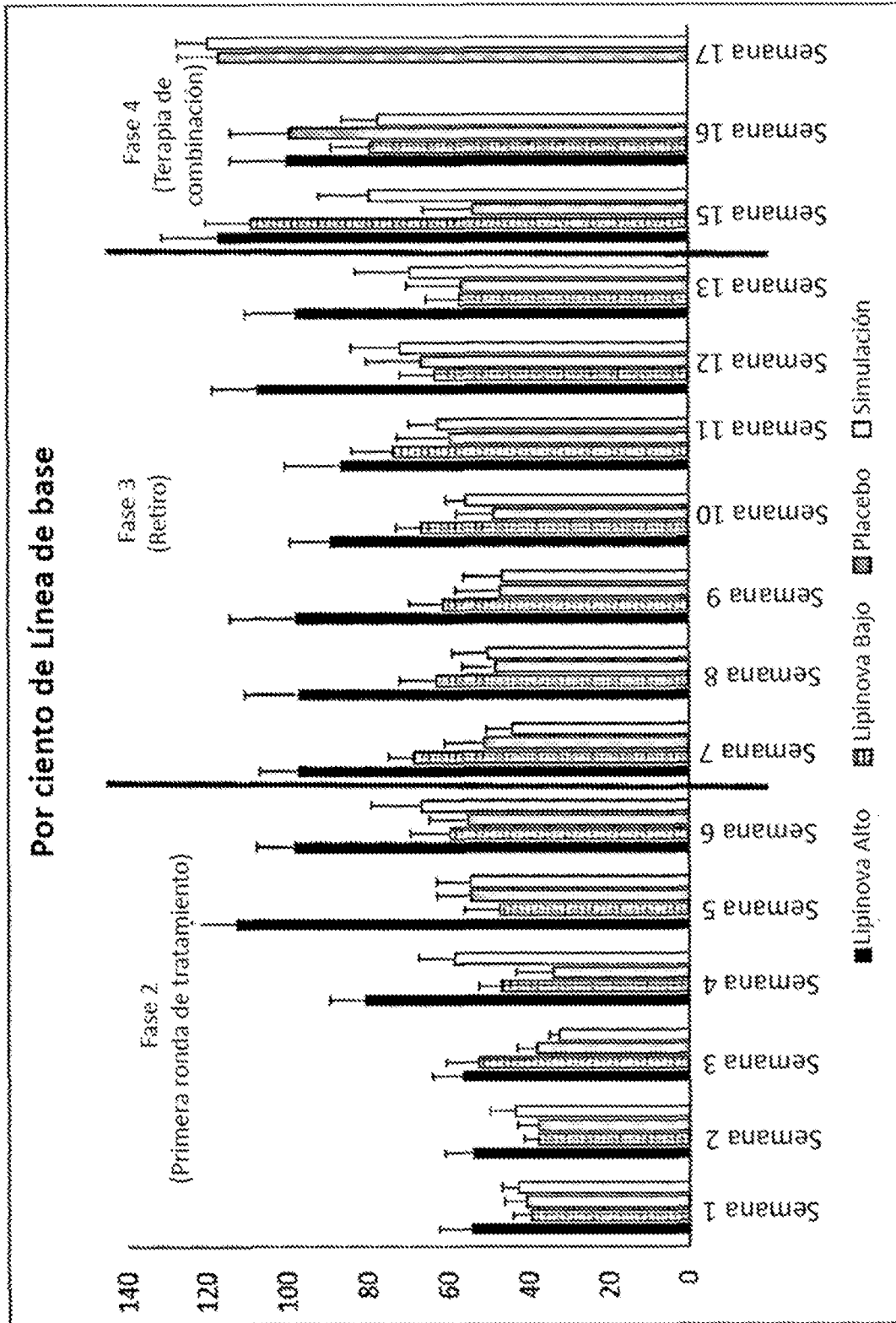


Figura 20

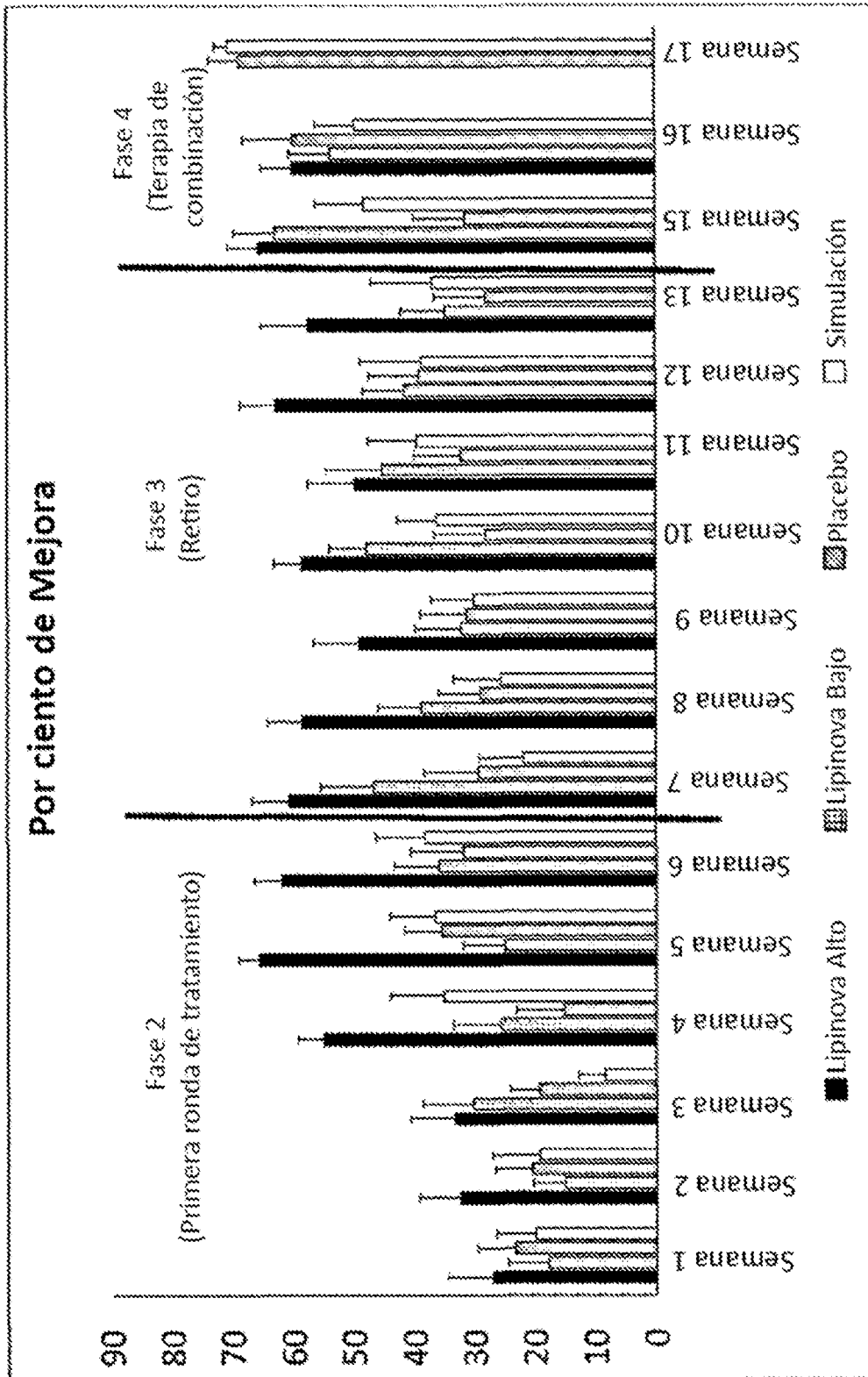
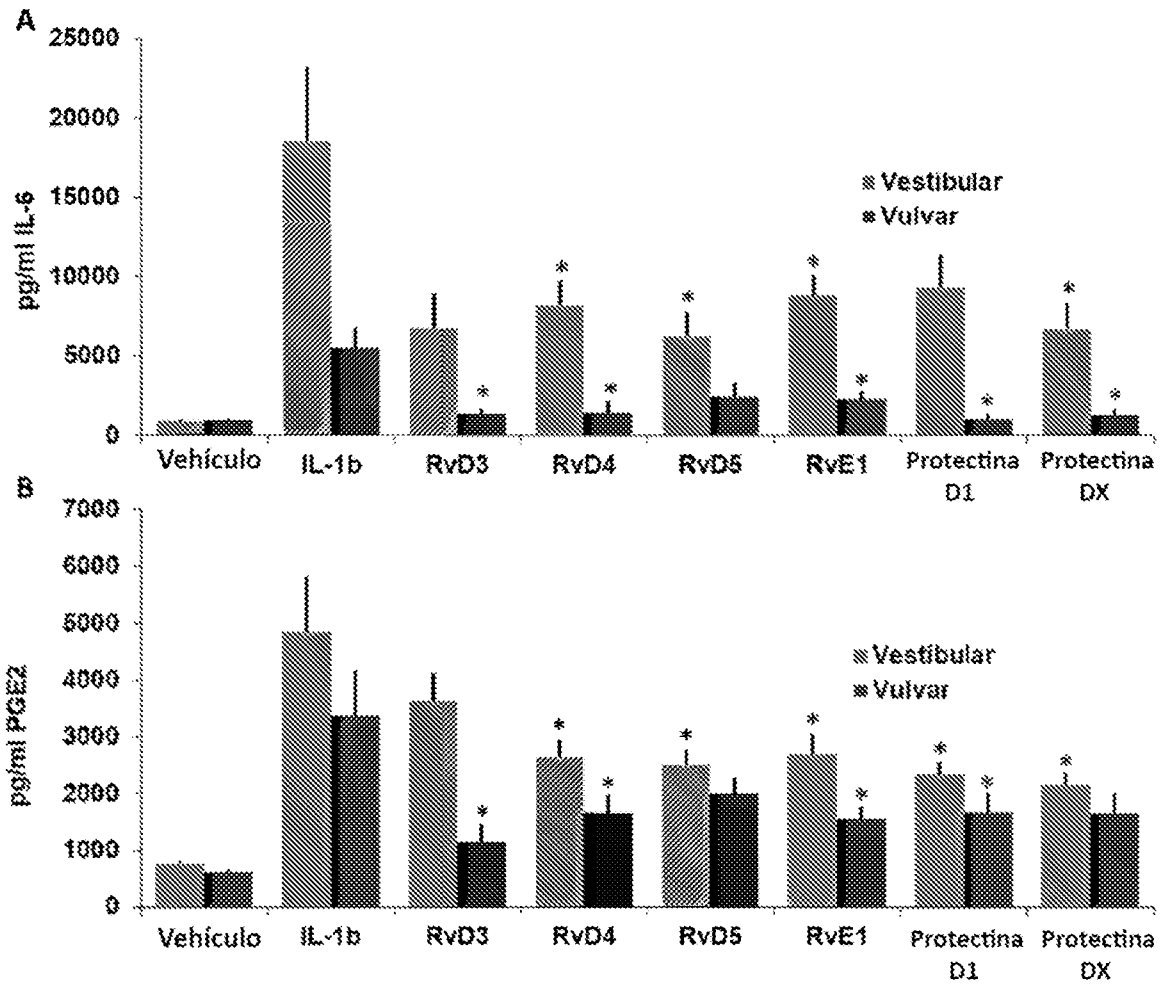
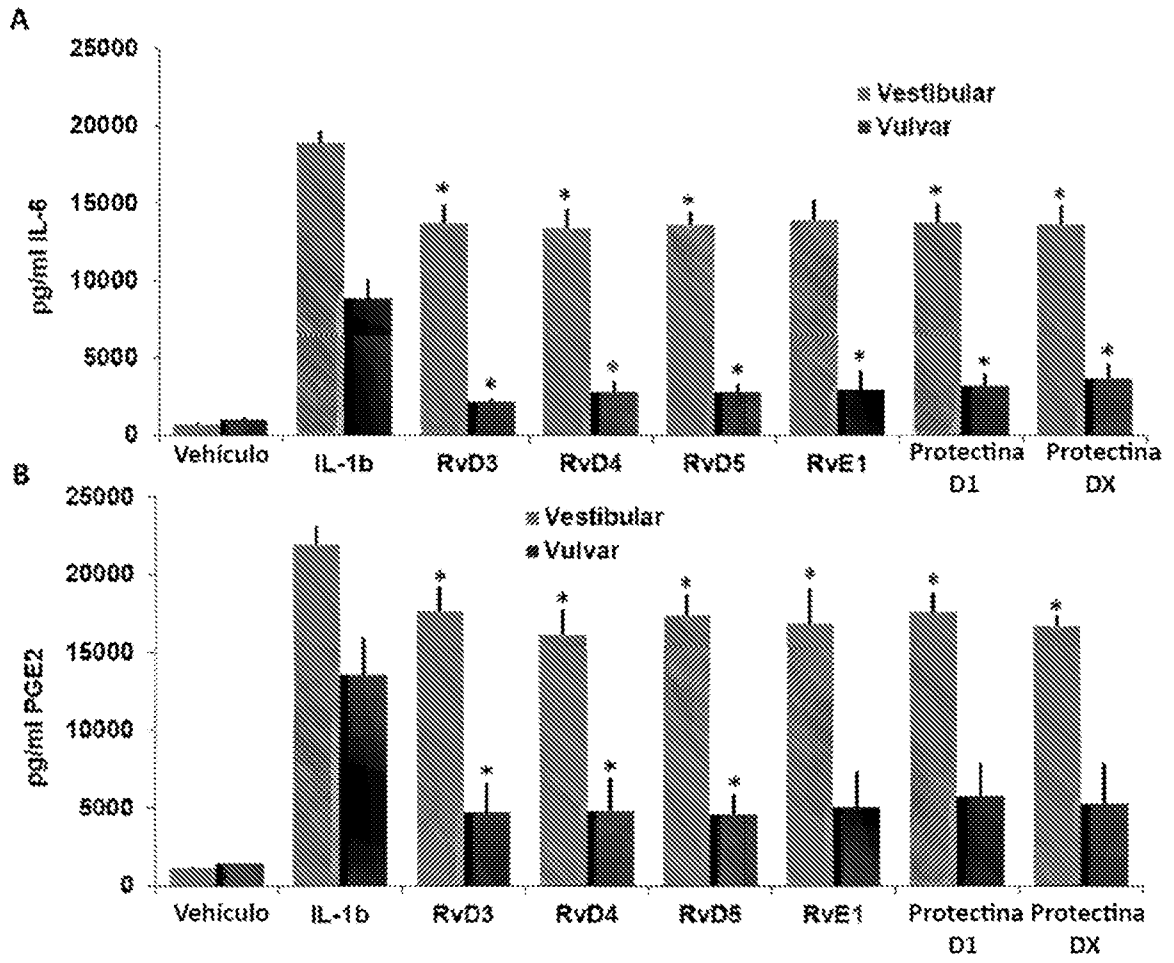


Figura 21



Figuras 23A y 23B



Figuras 24A y 24B